



Université de Montpellier 2 – Sciences et Techniques du Languedoc

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Montpellier 2

Discipline : Génie des Procédés

École Doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement par

Manuela BROS

Le 27 mars 2013

Fermentation de surface d'une viande pré-traitée par Déshydratation-Imprégnation par Immersion Étude cinétique sur aliment réel et milieu modèle

JURY

M. Alain KONDOYAN	Directeur de Recherche, Inra Theix	Rapporteur
M. Ivan LEGUÉRINEL	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Mme. Élodie ARNAUD	Chercheur, Cirad Réunion	Examineur
M. Philippe BOHUON	Maître de Conférences, Montpellier SupAgro	Examineur
Mme. Régine TALON	Directeur de Recherche, Inra Theix	Examineur
M. Antoine COLLIGNAN	Professeur, Montpellier SupAgro	Directeur de thèse

« Δεν ελπίζω τίποτα, δε φοβάμαι τίποτα, είμαι λέφτερος. »

« Je n'espère rien, je n'ai peur de rien, je suis libre. »

Nikos Kazantzakis

AVANT-PROPOS

Ce travail s'est déroulé au sein de l'UMR Qualisud au Cirad à Montpellier et à La Réunion et a bénéficié d'une bourse de thèse octroyée par l'Université de Montpellier II. Le fonctionnement des travaux de recherche ont été financés par le Cirad et la Région Réunion.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse Antoine COLLIGNAN et mes encadrants, Philippe BOHUON et Gérard LOISEAU pour toutes les connaissances prodiguées au long de ces trois ans. Aussi, j'adresse ma gratitude aux membres de mon comité, Thierry GOLI qui a été disponible et réactif quand j'ai sollicité ses compétences, et Régine TALON pour son implication notamment lors de la relecture des publications.

Je remercie également Patrice THAUNAY du Cirad Montpellier et Alban THOMAS de la société Legallais qui ont mis leurs compétences à l'œuvre pour la conception du dispositif expérimental utilisé dans ce travail.

Toute ma reconnaissance va aux équipes du Cirad à Montpellier et à La Réunion pour leur accueil chaleureux. J'accorde une mention particulière à Nadine LOPEZ, pour le soutien qu'elle m'a toujours apporté, à Joseph BASSAMA et Nadiarid JIMÉNEZ, un grand frère et une grande sœur d'adoption, à Aline CHAINE, Charlène DESBY et Stéphanie ROUX, des collègues devenues des amies très chères que je regrette déjà beaucoup, à Julien RICCI, qui en plus de son inconditionnelle disponibilité, a été là pour rectifier le tir dans un moment crucial, et à Amandine BAPTISTE, ma stagiaire, pour son travail acharné et son sourire qui ont été d'une valeur incalculable au cours de ma dernière année.

Je n'ai pas de mots assez forts pour remercier ma mère qui même à distance vit mes joies et mes peines comme si c'étaient les siennes.

Enfin, je dédie cette thèse à mon encadrante Elodie ARNAUD. Je lui suis à jamais reconnaissante pour les méthodes de travail qu'elle m'a inculqué et pour sa rigueur et son souci d'excellence qui m'ont toujours amenée vers le haut.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS

Bros M., Arnaud E., Loiseau G., Talon R., Collignan A. 2012. Feasibility of coupling Dehydration-Impregnation by Soaking treatment of meat with fermentation by *Lactobacillus sakei*. Journal of Food Science 77, M434-M440.

Bros M., Arnaud E., Bohuon P., Loiseau G., Talon R., Collignan, A. Use of an original device to model the effects of water activity, salt, pH, and lactic acid on *Lactobacillus sakei* surface growth. Soumis en février 2013 à Food Microbiology.

Bros M., Bohuon P., Arnaud E., Loiseau G., Collignan A. Integrated model for mass transfers and *Lactobacillus sakei* growth on the surface of meat after Dehydration-Impregnation by Soaking treatments. En préparation.

POSTER

Bros M., Arnaud E., Bohuon P., Loiseau G., Talon R., Collignan A. 2012. Dehydration-Impregnation by Soaking coupled with fermentation by *Lactobacillus sakei* in the treatment of meat. A Lunch Box for Tomorrow, EFFoST Annual Meeting, 20-23 November, Montpellier, France.

RÉSUMÉ

Les procédés de fabrication de produits carnés de salaison stables à température ambiante s'articulent autour de la théorie des barrières et du couplage d'opérations unitaires telles que le salage, le séchage, la fermentation, le fumage. Dans les pays du Nord, ces procédés traditionnels ou industrialisés, aboutissent à des produits finis à la fois stables à température ambiante et prêts-à-consommer. Pour contrecarrer l'altération de la viande, accrue en conditions tropicales ou en conditions d'hygiène non-maîtrisées, les procédés traditionnels mettent en œuvre des traitements plus drastiques et aboutissent à des produits nécessitant une préparation ultérieure pour être consommés (cuisson, dessalage).

L'objectif général de ce travail est de proposer un procédé innovant adapté aux pays du Sud et aux conditions tropicales aboutissant à un produit carné salé-séché-fermenté stable à température ambiante et prêt-à-consommer. L'innovation consiste à traiter des morceaux de viande en couplant une pré-stabilisation par Déshydratation-Imprégnation par Immersion (DII) à une étape maîtrisée de fermentation lactique de surface. Par une stratégie expérimentale progressive associée à la modélisation, cette thèse étudie le couplage de la DII à une fermentation de surface par *Lactobacillus sakei*

Les réponses apportées s'appuient sur trois volets. Une première étude sur aliment réel a validé le couplage DII-fermentation. Dans un deuxième temps, une étude en milieu modèle a mis en évidence l'influence des facteurs environnementaux d'intérêt (activité en eau, teneur en sel, pH et teneur en acide lactique) sur la croissance en surface de *L. sakei*. Enfin, un modèle global a été construit pour analyser le couplage entre les transferts de matière (eau, sel) entre la surface et le cœur des morceaux de viande, et la croissance de *L. sakei* à la surface.

Mots-clés : produits carnés, Déshydratation-Imprégnation par Immersion, fermentation de surface, *Lactobacillus sakei*, cinétiques de croissance, transferts de matière.

ABSTRACT

The fabrication of shelf-stable cured meat products is based on the hurdle technology and on the coupling of unit-operations such as salting, drying, fermentation and smoking. In Northern countries, these processes, whether traditional or industrialized, lead to end-products which are both shelf-stable and ready-to-eat. Meat spoilage is accelerated in tropical conditions or when the general hygiene is not controlled. In order to counteract it, traditional processes in these conditions use more drastic treatments and lead to end-products which require an additional preparation step before being consumed (cooking, desalting).

The general objective of this work is to propose an innovative process adapted to Southern countries and tropical conditions and leading to a salted/dried/fermented meat product which is shelf-stable and ready-to-eat. The innovation consists in treating meat pieces by coupling a pre-stabilization by Dehydration-Impregnation by Soaking (DIS) with a controlled surface lactic fermentation step. By means of a progressive experimental strategy associated with modelization, this thesis studies the coupling of DIS with a surface fermentation by *Lactobacillus sakei*.

The answers are arranged into three chapters. Firstly, a study on the real food product validated the DIS-fermentation coupling. Secondly, a study on a model device showed the influence of relevant environmental factors (water activity, salt content, pH and lactic acid content) on the surface growth of *L. sakei*. Finally, a global model was built to analyze the coupling of mass transfers (water, salt) between the surface and the core of the meat pieces, and growth of *L. sakei* at their surface.

Keywords: meat products, Dehydration-Impregnation by Soaking, surface fermentation, *Lactobacillus sakei*, growth kinetics, mass transfers.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	1
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	6
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	9
I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
I.1. CONSERVATION DE LA VIANDE PAR SALAGE, SÉCHAGE ET FERMENTATION	11
I.1.1. COMPOSITION DE LA VIANDE.....	11
I.1.1.1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET NUTRITIONNELLES.....	11
I.1.1.2. FLORE MICROBIENNE.....	12
I.1.2. THÉORIE DES BARRIÈRES.....	13
I.1.3. DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ EN EAU PAR SÉCHAGE ET SALAGE.....	15
I.1.3.1. SÉCHAGE.....	16
I.1.3.2. SALAGE.....	17
I.1.3.3. DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION (DII).....	18
I.1.4. ACIDIFICATION ET BIO-PROTECTION PAR FERMENTATION.....	20
I.1.4.1. ACIDIFICATION	20
I.1.4.2. BIO-PROTECTION.....	21
I.1.4.3. PRODUITS FERMENTÉS NON-DIVISÉS.....	22
I.2. LACTOBACILLUS SAKEI.....	23
I.2.1. HABITAT ET CLASSIFICATION	23
I.2.2. MÉTABOLISME.....	23
I.2.2.1. MÉTABOLISME DES GLUCIDES.....	23
I.2.2.2. BESOINS NUTRITIONNELS	25
I.2.2.3. AUTRES ACTIVITÉS MÉTABOLIQUES	26
I.2.3. ADAPTATION AU MILIEU VIANDE	26
I.2.3.1. TEMPÉRATURE	26
I.2.3.2. STRESS OSMOTIQUE.....	27
I.2.3.3. ACIDE LACTIQUE.....	27
I.2.3.4. CATABOLISME DE L'ARGININE	28

I.2.3.5.	PRODUCTION DE BACTÉRIOCINES.....	29
I.2.3.6.	NOTION DE « CROSS-PROTECTION » ET ADAPTATION À LONG TERME.....	30
I.3.	MODÉLISATION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE.....	31
I.3.1.	CROISSANCE MICROBIENNE ET MICROBIOLOGIE PRÉVISIONNELLE.....	31
I.3.2.	MODÈLES PRIMAIRES	32
I.3.2.1.	MODÈLE DE GOMPERTZ.....	32
I.3.2.2.	MODÈLE TRI-LINÉAIRE	33
I.3.2.3.	MODÈLE LOGISTIQUE AVEC DÉLAI ET RUPTURE	34
I.3.2.4.	MODÈLE DE BARANYI ET ROBERTS.....	34
I.3.2.5.	MODÈLE DE HUANG	36
I.3.3.	MODÈLES SECONDAIRES	36
I.3.3.1.	APPROCHE MULTIFACTORIELLE	37
I.3.3.2.	APPROCHE MODULAIRE.....	37
I.3.3.3.	EXEMPLES D'UTILISATION DE MODÈLES SECONDAIRES.....	39
I.3.4.	DÉFIS DE LA MODÉLISATION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE DANS UN ALIMENT RÉEL.....	41
I.3.4.1.	CROISSANCE SUR UN SUPPORT SOLIDE.....	42
I.3.4.2.	STRATÉGIES DE MODÉLISATION PRENANT EN COMPTE L'EFFET MATRICE	42
I.3.4.3.	BONNES PRATIQUES DE MODÉLISATION.....	43
I.4.	POSITIONNEMENT DE LA THÈSE	45
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	47
II.1.	DÉROULEMENT DES ESSAIS.....	47
II.1.1.	ÉTUDE SUR ALIMENT RÉEL	47
II.1.1.1.	PRÉPARATION DES FILETS DE VIANDE.....	47
II.1.1.2.	TRAITEMENT DES FILETS DE VIANDE PAR DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION	47
II.1.1.3.	SOUCHE DE <i>LACTOBACILLUS SAKAI</i>	49
II.1.1.4.	PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D'INOCULATION	49
II.1.1.5.	INOCULATION ET INCUBATION DES FILETS DE VIANDE.....	49
II.1.1.6.	ÉCHANTILLONNAGE.....	49
II.1.2.	ÉTUDE EN MILIEU MODÈLE	50
II.1.2.1.	FONCTIONNEMENT DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL	50
II.1.2.2.	MILIEU DE CULTURE LIQUIDE CONTENU DANS LE DISPOSITIF.....	51

II.1.2.3.	FORMULATION DU MILIEU DE CULTURE CONTENU DANS LE DISPOSITIF	52
II.1.2.4.	SOUCHE DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i>	53
II.1.2.5.	PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D'INOCULATION	54
II.1.2.6.	INOCULATION ET INCUBATION DES DISPOSITIFS.....	54
II.1.2.7.	ÉCHANTILLONNAGE.....	54
II.2.	MÉTHODES ANALYTIQUES.....	55
II.2.1.	ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	55
II.2.1.1.	MESURE DE L'ACTIVITÉ EN EAU	55
II.2.1.2.	MESURE DE LA TENEUR EN EAU.....	55
II.2.1.3.	MESURE DE LA TENEUR EN SEL.....	55
II.2.1.4.	MESURE DU PH.....	55
II.2.1.5.	DOSAGE DU D-GLUCOSE ET DES ACIDES D- ET L-LACTIQUE	56
II.2.2.	ANALYSES MICROBIOLOGIQUES	56
II.2.2.1.	DÉNOMBREMENTS.....	56
II.2.2.2.	PCR QUANTITATIVE.....	57
II.3.	TRAITEMENT DES DONNÉES	58
II.3.1.	TRAITEMENT STATISTIQUE.....	58
II.3.2.	TRANSFERTS DE MATIÈRE AU COURS DE LA DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION	58
II.3.3.	MODÈLE DE DIFFUSION D'EAU ET DE SEL AU SEIN DE LA VIANDE.....	59
II.3.4.	MODÈLES DE CROISSANCE BACTÉRIENNE	61
II.3.4.1.	MODÈLE PRIMAIRE	61
II.3.4.2.	INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX.....	62
II.3.5.	MODÈLE INTÉGRANT LES TRANSFERTS DE MATIÈRE AU COURS ET APRÈS DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION ET LA CROISSANCE EN SURFACE DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i>	63
III.	RÉSULTATS	65
III.1.	COUPLAGE SUR ALIMENT RÉEL DE LA DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION À UNE FERMENTATION LACTIQUE DE SURFACE.....	65
III.1.1.	INTRODUCTION	65
III.1.2.	TEXTE DE LA PUBLICATION PARUE DANS JOURNAL OF FOOD SCIENCE : FEASIBILITY OF COUPLING DEHYDRATION-IMPREGNATION BY SOAKING TREATMENT OF MEAT WITH FERMENTATION BY <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i>	66
III.1.2.1.	ERRATUM	73

III.1.3.	SYNTHÈSE DES RÉSULTATS.....	73
III.1.3.1.	RÉSULTATS DÉVELOPPÉS DANS L'ARTICLE.....	73
III.1.3.2.	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....	73
III.1.3.3.	CONCLUSION.....	75
III.2.	ÉTUDE EN MILIEU MODÈLE DE LA CROISSANCE EN SURFACE DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i>	76
III.2.1.	INTRODUCTION.....	76
III.2.2.	TEXTE DE LA PUBLICATION SOUMISE À FOOD MICROBIOLOGY : USE OF AN ORIGINAL DEVICE TO MODEL THE EFFECTS OF WATER ACTIVITY, SALT, PH, AND LACTIC ACID ON <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> SURFACE GROWTH.....	77
III.2.3.	SYNTHÈSE DES RÉSULTATS.....	98
III.2.3.1.	RÉSULTATS DÉVELOPPÉS DANS L'ARTICLE.....	98
III.2.3.2.	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....	98
III.2.3.3.	CONCLUSION.....	101
III.3.	MODÉLISATION DE LA CROISSANCE DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> À LA SURFACE D'UNE VIANDE APRÈS DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION.....	102
III.3.1.	INTRODUCTION.....	102
III.3.2.	TEXTE DE LA PUBLICATION : INTEGRATED MODEL FOR MASS TRANSFERS AND <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> GROWTH ON THE SURFACE OF MEAT AFTER DEHYDRATION-IMPREGNATION BY SOAKING TREATMENTS (EN PRÉPARATION).....	103
III.3.3.	SYNTHÈSE DES RÉSULTATS.....	125
III.3.3.1.	RÉSULTATS DÉVELOPPÉS DANS L'ARTICLE.....	125
III.3.3.2.	CONCLUSION.....	125
IV.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	127
IV.1.	CONSTRUCTION D'UN PROCÉDÉ INNOVANT AUTOUR DU COUPLAGE DE LA DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION À UNE FERMENTATION LACTIQUE DE SURFACE.....	129
IV.2.	MISE AU POINT D'UN DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ORIGINAL D'ÉTUDE DE LA CROISSANCE MICROBIENNE EN SURFACE.....	131
IV.2.1.	HYPOTHÈSE ÉMISE : CROISSANCE EN SURFACE, UN EFFET PROTECTEUR ?.....	131
IV.2.2.	CONCEPTION DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	132

IV.2.2.1.	CHOIX DU SUPPORT DE CROISSANCE.....	133
IV.2.2.2.	CHOIX DU MILIEU DE CULTURE CONTENU DANS LE DISPOSITIF.....	134
IV.2.2.3.	CHOIX DES CONDITIONS DE PRÉ-CULTURE.....	135
IV.2.3.	VALIDATION DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	136
IV.2.3.1.	RÉPÉTABILITÉ DE LA CROISSANCE EN SURFACE DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> EN DISPOSITIF	136
IV.2.3.2.	VALIDATION DE LA NON-CONTAMINATION DU MILIEU DE CULTURE CONTENU DANS LE DISPOSITIF	136
IV.2.3.3.	VALIDATION DU FONCTIONNEMENT DU DISPOSITIF EN CONDITIONS NON-LIMITANTES.....	137
IV.3.	MODÉLISATION DE LA CROISSANCE EN SURFACE DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i>.....	139
IV.3.1.	HYPOTHÈSE ÉMISE : ÉTUDE D'UNE FLORE BÉNÉFIQUE, UNE PROBLÉMATIQUE DIFFÉRENTE ?	139
IV.3.2.	CONSTRUCTION DU MODÈLE.....	140
IV.3.2.1.	CHOIX DU MODÈLE PRIMAIRE	140
IV.3.2.2.	UTILISATION DU GAMMA-CONCEPT POUR DÉCRIRE L'INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX...142	
IV.3.2.3.	PARAMÈTRES LAMBDA ET μ_{MAX} : TOUJOURS PROPORTIONNELS ?.....	142
IV.3.2.4.	N_{MAX} : UN PARAMÈTRE PUREMENT EMPIRIQUE ?	144
IV.3.3.	INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX.....	145
IV.3.3.1.	FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ÉTUDIÉS.....	145
IV.3.3.2.	LE GLUCOSE : EST-IL UN FACTEUR D'ÉTUDE PERTINENT ?	146
IV.3.4.	CONSTRUCTION D'UNE BASE DE DONNÉES EXPÉRIMENTALES	147
IV.3.5.	INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE MÉTABOLISME DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> : UNE LIMITE DU DISPOSITIF	147
IV.4.	ÉLABORATION D'UN OUTIL D'AIDE À LA DÉCISION POUR L'OPTIMISATION DU COUPLAGE DII-FERMENTATION	149
IV.4.1.	STRUCTURE DU MODÈLE GLOBAL : IMPACT DES TRANSFERTS DE MATIÈRE SUR LA CROISSANCE DE <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> À LA SURFACE D'UNE VIANDE PRÉ-TRAITÉE PAR DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION	149
IV.4.2.	PREMIERS RÉSULTATS : CONDITIONS DE DII COMPATIBLES AVEC LE COUPLAGE DII-FERMENTATION.....	150
IV.4.3.	PERSPECTIVES D'AMÉLIORATION : INFLUENCE DE L'ACIDE LACTIQUE.....	151
	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	153
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
	ANNEXE	177

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Abréviations

ADN (DNA)	Acide DésoxyRibonucléique
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ARNr (rRNA)	Acide RiboNucléique ribosomal
ATP	Adénosine TriPhosphate
b.h. (w.b.)	base humide
b.s.	base sèche
Cirad	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CM	Cardinal Model
DE	Dextrose Équivalent
DII (DIS)	Déshydratation-Imprégnation par Immersion
DO (OD)	Densité Optique
EPS	Exo-PolySaccharide
FME	Finite Element Method
G1	Glucose
G2	Maltose
G3	Maltotriose
G4	Maltotetraose
<i>L. sakei</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
La ⁻	Lactate
LAB	Lactic Acid Bacteria
LaH	acide lactique non-dissocié
Inra	Institut national de la recherche agronomique
IS	Inhibitory Substance
ITS	Intergenic Transcribed Spacer
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MRS	de Man Rogosa & Sharpe
MYG	Meat Yeast Glucose
ODE	Ordinary Differential Equation
p/p (w/w)	poids/poids
p/v (w/v)	poids/volume
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Partial Differential Equation
PES	PolyEtherSulfone
qPCR	PCR quantitative
SAB	Sabouraud
SR	Square Root
UFC (CFU)	Unité Formant Colonie
UMR	Unité Mixte de Recherche

Symboles

A	[-]	Absorbance
a_w	[-]	activité en eau
C_t	[-]	valeur du cycle seuil de fluorescence
DE 21		sirop de glucose DE 21

	[m ² /s]	coefficient de diffusion effectif
GGlu (GluG)	[% masse initiale]	Gain en Glucose
GS (SaG)	[% masse initiale]	Gain en Sel
GSu (SuG)	[% masse initiale]	Gain en Sucres
HR (RH)	[%]	Humidité Relative
L	[m]	épaisseur du filet
m	[g]	masse, molalité
MSE	[-]	Mean Squared Error
n	[-]	paramètre de forme, nombre de répétitions
N	[UFC]	population bactérienne
n_p	[-]	nombre de paramètres
n_t	[-]	nombre de points expérimentaux
PE (WL)	[% masse initiale]	Perte en Eau
PP	[% masse initiale]	Perte en Poids
q_o	[-]	état physiologique des cellules
RMSE	[-]	Root Mean Squared Error
t	[s]	temps
T	[°C]	température
TE (WC)	[g/100g b.h.]	Teneur en Eau
t_g	[h]	temps de génération
TGlu (GluC)	[g/100g b.h.]	Teneur en Glucose
T_m	[°C]	Température de fusion de l'ADN
TS (SaC)	[g/100g b.h.]	Teneur en Sel
w	[-]	fraction massique
X		facteur environnemental
y	[-]	logarithme népérien de la population bactérienne
\hat{y}	[-]	logarithme népérien simulé de la population bactérienne
z	[m]	position au sein du filet
Lettres grecques		
α	[-]	risque de première espèce, paramètre de courbure du modèle primaire décrivant la transition de la phase de latence à la phase exponentielle
γ	[-]	fonction décrivant l'effet de facteurs environnementaux sur un paramètre du modèle primaire (μ_{\max} , λ)
λ	[h]	durée de la phase de latence
μ_{\max}	[h ⁻¹]	vitesse spécifique de croissance maximale
Indices		
0		centre du filet, instant initial
∞		condition aux limites
DE 21		sirop de glucose DE 21
f		final
gly		glycérol
i		initial
max		maximum
opt		optimum
ref		référence
w		water

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les procédés de fabrication des produits carnés de salaison stables à température ambiante s'articulent autour de la théorie des barrières et du couplage d'opérations unitaires (salage, séchage, fermentation, fumage) qui construisent ces barrières (diminution de l'activité en eau, acidification, bio-protection, etc.) pour aboutir à la stabilité microbiologique du produit fini. De manière traditionnelle, dans les pays du Nord, ces procédés sont conduits à température et humidité relative ambiantes faibles. En conditions tropicales, la fabrication des produits carnés de salaison telle qu'elle se déroule dans les pays du Nord, n'est pas envisageable du fait de températures et humidité accrues qui mènent à l'altération de la viande plutôt qu'à sa stabilisation. En vue de contrecarrer cette altération, les procédés traditionnels mettent en œuvre des barrières plus drastiques. Peuvent s'ajouter à cela, dans les pays du Sud, un manque d'infrastructures et des conditions d'hygiène non maîtrisées. On aboutit alors à des produits pouvant être très salés et/ou très secs et présentant parfois une flore d'altération élevée. Aussi, ces produits font traditionnellement l'objet d'une préparation ultérieure (réhydratation, dessalage par trempage, cuisson).

Au sein de l'UMR Qualisud, ces constats ont mené à vouloir concevoir un procédé innovant qui revisite l'agencement des barrières pour travailler sur des morceaux de viande et obtenir, en conditions tropicales, un produit salé-séché-fermenté stable à température ambiante et prêt-à-consommer. La première innovation consiste à utiliser la Déshydratation-Imprégnation par Immersion (DII) en solution ternaire eau-sel-sucre afin de combiner, dans une première étape, une déshydratation et un salage de la viande qui conduisent à une diminution de son activité en eau. L'établissement de cette première barrière permet de pré-stabiliser la viande. Par la suite, l'étape de fermentation construit deux barrières supplémentaires : l'acidification par le métabolisme fermentaire des bactéries lactiques, et la bio-protection du produit du fait de la colonisation du milieu par une flore lactique. Traditionnellement, ces barrières se construisent spontanément grâce à la flore lactique endogène présente dans l'environnement de

transformation. Dans le cadre du procédé innovant, il est proposé d'inoculer la surface de la viande avec une souche de *Lactobacillus sakei*. *L. sakei* est une bactérie lactique endogène de la viande couramment employée en Europe comme starter du fait de son adaptation évolutive au milieu viande et aux conditions environnementales régnant au cours de la fabrication des produits carnés de salaison. Enfin, le procédé comportera une étape de séchage à l'air. Cette étape modulera les caractéristiques du produit fini en termes de teneurs en eau et en sel au travers de la déshydratation, et permettra l'affinage par l'action protéolytique et lipolytique des enzymes de la flore microbienne du produit.

Le présent travail de thèse concerne l'étude du couplage des étapes de DII et de fermentation lactique à la surface de la viande. Il amène des éléments de réponse à la question de savoir comment formuler de la viande par DII pour permettre le bon déroulement de l'étape de fermentation. La DII doit pré-stabiliser le produit pour le protéger des flores pathogènes et d'altération mais toutefois permettre un développement d'un starter sélectionné de *L. sakei*. Les réponses apportées s'organisent en trois volets abordés au travers de la présentation pour chacun d'une publication parfois accompagnée de résultats complémentaires, soit :

- une première étude sur aliment réel a pour objectif de valider la faisabilité du couplage DII-fermentation,
- puis un travail en milieu modèle étudie l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance en surface de *L. sakei*,
- et enfin un modèle global est construit pour analyser le couplage entre la croissance en surface et les transferts de matière du fait de la DII.

I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. CONSERVATION DE LA VIANDE PAR SALAGE, SÉCHAGE ET FERMENTATION

I.1.1. COMPOSITION DE LA VIANDE

I.1.1.1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET NUTRITIONNELLES

La viande, dont la composition moyenne est donnée dans la Figure 1 adaptée de Kauffman (2012), est une denrée alimentaire de haute qualité nutritionnelle (Pearson & Gillet, 1999; Higgs, 2000) pour trois raisons principales :

- son contenu en acides aminés essentiels,
- sa richesse en vitamines du groupe B et particulièrement la vitamine B₁₂ dont les produits animaux sont la seule source alimentaire,
- sa richesse en fer héminique, mieux assimilé par l'organisme humain que le fer non-héminique présent dans les végétaux.

Muscle frais			
Composés non azotés		79	-
Composés azotés		21	-
<u>Eau</u>		72	100
Libre		63	87
Liée		9	13
<u>Lipides</u>		5	100
Tryglycérides		5	98
Phospholipides		<	1
Acides gras libres		<	1
<u>Minéraux</u>		1	100
Potassium		1	46
Phosphore		<	29
Sodium		<	12
Chlore		<	8
Magnésium		<	3
Calcium		<	1
Fer		<	1
Zinc et autres éléments à l'états de traces		<	<
<u>Carbohydrates</u>		1	100
Acide lactique		1	75
Glucose-6-phosphate		<	13
Glycogen		<	8
Glucose, etc.		<	4
<u>Vitamines liposolubles</u>			
A, D, E, et K		<	100
<u>Non-protéines</u>		2	-
<u>Vitamines hydrosolubles</u>		<	100
Niacine (B3)		<	48
Ac. pantothénique (B5)		<	46
Pyridoxine (B6)		<	3
Riboflavine (B2)		<	2
Thiamine* (B1)		<	1
Cobalamine (B12), biotine (B8), acide folique (B9)		<	<
<u>Autres</u>		2	100
Créatine		<	34
Acides aminés libres		<	21
Carnosine, anserine		<	21
Inosine monophosphate		<	18
Autres nucléotides		<	6
<u>Composition élémentaire</u>			
<u>Elément</u>	<u>% masse</u>		
Oxygène	73		
Carbone	14		
Hydrogène	10		
Azote	3		
Souffre et autres éléments inorganiques	<		
<u>Protéines</u>		19	-
Myofibrillaires		11	-
Sarcoplasmiques		6	-
Tissu conjonctif		1	-
Granulaires		1	-
<u>Composition en acides aminés</u>			
<u>Essentiels</u>	<u>% moles</u>		
Arginine	7		
Histidine	3		
Isoleucine	5		
Leucine	8		
Lysine	8		
Méthionine	3		
Phénylalanine	4		
Thréonine	4		
Tryptophane	1		
Valine	6		
Sous-total	49		
<u>Non-essentiels</u>			
Alanine	7		
Acide aspartique et asparagine	9		
Cystine et cystéine	1		
Acide glutamique et glutamine	15		
Glycine	7		
Proline	5		
Serine	4		
Tyrosine	3		
Hydroxyproline	<		
Sous-total	51		
% par rapport au muscle par catégorie			
Composé		Total 100	Total 100

* le contenu en thiamine est environ 8 fois plus élevé dans le muscle de porc.

Données pour des muscles après maturation post-rigor représentant diverses espèces.

Figure 1. Composition moyenne de la viande. Adapté de : Kauffman (2012).

I.1.1.2. FLORE MICROBIENNE

La viande est une denrée hautement périssable en raison de sa richesse et de sa diversité en nutriments (acides aminés, peptides, nucléotides, sucres), de son pH et de son activité en eau élevés. Le muscle d'un animal vivant et sain est stérile mais du fait des conditions d'abattage, d'échaudage, d'éviscération, de découpe et de maturation, une flore microbienne s'installe sur la surface de la viande. Si cette flore n'est pas maîtrisée par réfrigération et/ou par des procédés de

transformation ultérieurs, elle se développe et conduit à l'altération de la viande en quelques jours. Cette flore d'altération est décrite dans les revues de Labadie (1999) et McDonald & Sun (1999) ou dans les travaux d'Ercolini *et al.* (2009). En ce qui concerne la flore aérobie, le genre protéolytique *Pseudomonas* spp. est majoritaire avec l'espèce *Pseudomonas fragi* la plus fréquemment isolée. L'espèce *Brochothrix thermosphacta*, psychrotrophe et aérobie facultative, est souvent présente dans les produits carnés réfrigérés. Dans les produits conditionnés sous atmosphère modifiée ou sous vide, les bactéries lactiques, et notamment *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus sakei*, alors considérées comme des flores d'altération, deviennent majoritaires. Enfin, des bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, ou des entérobactéries telles que *Salmonella* spp. ou *Escherichia coli* O157:H7, peuvent aussi se développer sur la viande et mener à des toxi-infections entériques d'origine alimentaire très graves.

I.1.2. THÉORIE DES BARRIÈRES

Selon Leistner (2000), les caractéristiques finales des produits transformés, aussi bien en termes de qualités organoleptique et nutritionnelle que de stabilité microbiologique, sont établies par l'application d'une combinaison de méthodes de conservation appelées des barrières. Ceci est vrai à la fois dans les procédés de fabrication traditionnels pour lesquels ces barrières sont empiriques mais aussi dans les procédés industriels où ces barrières sont sélectionnées et appliquées de façon plus maîtrisée. Tout l'intérêt de cette théorie réside dans la possibilité de combiner différentes barrières et d'ajuster leur « hauteur », afin d'aboutir à une configuration optimale pour atteindre les qualités organoleptique et nutritionnelle attendues du produit tout en assurant sa stabilité microbiologique et son innocuité. L'application de cette théorie prend toute son importance lors de la conception de nouveaux procédés mais aussi lorsque l'on revisite des procédés traditionnels en vue de les comprendre et de les optimiser.

Les barrières les plus efficaces et les plus couramment rencontrées dans la conservation des aliments sont : la température, l'activité en eau, le pH, le potentiel redox, l'ajout de conservateurs (nitrites, sulfites, etc.) et la bio-protection par des flores microbiennes bénéfiques et

compétitives (bactéries lactiques). Les procédés de fabrication des produits carnés, se construisent autour de cette théorie des barrières en couplant diverses opérations unitaires : ajout de conservateurs, cuisson, fermentation, fumage, marinage, salage, séchage.

Dans les pays tropicaux, le contexte climatique et parfois technico-économique joue un rôle important dans le cadre de l'agencement de la théorie des barrières au sein des procédés de fabrication de produits carnés stables à température ambiante. Il s'agit notamment des conditions de température et d'humidité relative plus élevées que dans les pays tempérés, du manque d'infrastructures pour assurer le maintien de la chaîne du froid et de la difficulté à maîtriser les bonnes pratiques de fabrication. Il en résulte un risque d'altération des aliments carnés plus élevé qui impose de mettre en œuvre des traitements plus drastiques, des barrières « plus hautes », afin de lutter contre l'altération de la viande. En conséquence, les produits finis qui résultent de ces procédés sont plus transformés (plus secs, plus salés) et possèdent souvent des charges microbiennes trop élevées. Ces produits ne peuvent donc pas être considérés comme des aliments prêts à consommer étant donné que des étapes de dessalage (comme pour le boucané réunionnais) ou de cuisson (comme pour le *charque* brésilien) sont nécessaires avant consommation.

Le Tableau 1 d'après Santchurn *et al.* (2011), présente une gamme de produits carnés consommés dans le monde, issus de combinaison d'opérations unitaires telles que le salage, le séchage, la fermentation et/ou le fumage.

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques de différents produits carnés séchés consommés dans le monde. Source : Santchurn et al. (2011).

Type	Meat Products	Origin	Water Content (% wet basis)	a_w	Salt Content (% wet basis)	Reference
Dried	Kilishi	Sahel African Countries	7.5–20	0.65	—	(Igene and others, 1989; Kalilou and others, 1998; Kalilou and Zakhia, 1999)
Salted dried	Sharmoot	Chad	8–13	—	—	(Hugoo, 1993)
	Biltong	South Africa	8–44	0.60–0.84	3.5–7.7	(Van der Riet, 1976)
	Unam inung	Nigeria	31–56	—	—	(Solomon and others, 1994)
	Came do sol	Brazil	64–70	0.94	5–6	(Norman and Corte, 1985)
	Charque (or charqui)	Brazil	44–45	0.87–0.91	12–15	(Norman and Corte, 1985)
	Tasajo	Cuba	33	0.75	24	(Chenoll and others, 2007)
	Sou gan	China	8–16	0.4–0.66	3.7–5.1	(Rao, 1997)
	Dendeng gilling	Indonesia	19–21	0.62–0.66	6.9–7.7	(Rao, 1997)
	Pastirma	East Mediterranean	39–52	0.85–0.90	2.7–9	(Kilic, 2009)
Salted dried smoked	Cecina	Mexico	61–65	0.89–0.90	8.1–10.0	(Reyez-Cano and others, 1994)
	Banda	Nigeria	8–16	—	—	(Obanu, 1988)
	Kundi	Nigeria	48.8–62.9	0.73–0.90	0.5	(Alonge, 1987)
Salted fermented dried	Boucané	Réunion	25	0.83	—	(Poligné and others, 2001)
	Uzice beef prshuta	Serbia	40	—	4.3	(Tomic and others, 2007)
	Salted dried duck fillets	France	—	0.93	5	(Poma, 1998)
	Dry cured lacón	Spain	40	0.77	12	(Lorenzo and others, 2003)
	Parma ham	Italy	59–64	0.92	4–6	(Baldini and Raczynski)
	Ham	Argentina	48–53	0.77–0.81	9.4–15.5	(Aguilera, 1990)
	Serrano ham	Venezuela	47	0.88	8.9	(Aguiler and others, 1990)
	Serrano ham	Spain	52	0.9	6–7	(Arnau and Monfort, 1998)
	Cecina de León	Spain	50–60	0.87–0.93	5.7–7.5	(Molinero and others, 2008)
	Bresaola	Italy	61–63	0.88–0.95	—	(Palaeari and others, 2000; 2002)
	Grisons meat	Switzerland	46–53	—	—	(Office fédéral de l'agriculture, 1999)
	Kaddid	Morocco	7.5–14.3	0.49–0.65	7–12	(Bennani and others, 1995)
	French fermented sausage	France	35–37	0.89	4.0–5.4	(Durand, 1999)
	Sucuk	Turkey	26–47	0.82–0.85	2.5–3.5	(Kilic, 2009)

I.1.3. DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ EN EAU PAR SÉCHAGE ET SALAGE

La diminution de la quantité d'eau disponible permet de diminuer le développement microbien ce qui limite l'altération microbiologique de la viande (Tableau 2 adapté de Zukál & Incze (2010)).

Tableau 2. Limite inférieure de l'activité en eau pour le développement des microorganismes. Adapté de : Zukál & Incze (2010).

Bactéries	Levures	Moisissures	a_w
<i>Escherichia coli</i>			0,99
<i>Clostridium botulinum</i>			0,97
<i>Campylobacter spp.</i>			0,97
<i>Shigella</i>			0,97
<i>Yersinia enterocolitica</i>			0,97
<i>Clostridium perfringens</i>			0,96
<i>Bacillus cereus</i>			0,96
<i>Bacillus subtilis</i>			0,95
<i>Salmonella newport</i>			0,95
<i>Lactobacillus</i>	<i>Saccharomyces</i>		0,90
<i>Pediococcus</i>			0,90
	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus niger</i>	0,88
		<i>Debaryomyces</i>	0,88
<i>Staphylococcus aureus</i>			0,86
<i>Listeria monocytogenes</i>			0,83
		<i>Penicillium</i>	0,80
<i>Bactéries halophiles</i>			0,75
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		0,60

I.1.3.1. SÉCHAGE

Le séchage à l'air est la technique la plus ancestrale mise en œuvre pour la déshydratation de la viande, notamment dans les pays du Sud dans lesquels la viande est découpée en fines lanières pour accélérer sa déshydratation et lutter contre son altération (Campbell-Platt, 1995). D'autres procédés de déshydratation de la viande tels que la friture et la lyophilisation cités par Collignan *et al.* (2008) ne seront pas abordés ici.

Un exemple de produit carné séché est le *kilishi* consommé en Afrique sahélienne dont le procédé de fabrication est décrit par Santchurn *et al.* (2011). Il s'agit de fines lanières (3 à 4 mm d'épaisseur par 0,5 à 1 m de long) de viande de bœuf généralement (parfois aussi de la viande de chèvre, de mouton ou de chameau) séchées au soleil jusqu'à atteindre 10-20 % de teneur en eau puis nappées d'un mélange d'épices et grillées sur un feu de bois.

Zukál & Incze (2010) donnent la relation entre la teneur et l'activité en eau d'une viande fraîche (Figure 2).

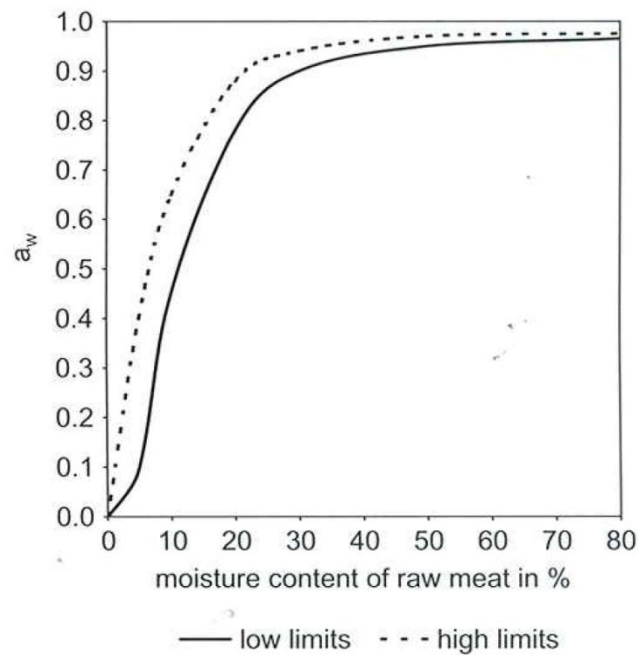


Figure 2. Relation entre la teneur en eau et l'activité en eau d'une viande. Source : Zukál & Incze (2010).

En reportant sur cette courbe les teneurs en eau de 10-20 % du *kilishi* avant d'être grillé sur cette courbe, on obtient une activité en eau inférieure à 0,90. Cependant, cette réduction d'activité en eau par le séchage seul a pour conséquence une modification assez drastique de la texture du produit qui peut devenir très dur. C'est pour cette raison que le séchage s'effectue rarement seul étant le plus souvent accompagné d'un salage des produits (Zukál & Incze, 2010).

I.1.3.2. SALAGE

Le salage s'effectue, pour les produits divisés, par ajout dans la formulation de la mûlée, et pour les produits entiers par frottement au sel sec ou par trempage dans ou injection de saumure. L'incorporation de ce soluté osmo-dépresseur permet d'abaisser l'activité en eau du produit autrement que par le départ d'eau résultant du séchage. On aboutit ainsi à des produits dits « à humidité intermédiaire ». Ces produits ont une teneur en eau comprise entre 20 et 50 % et une activité en eau de 0,60 à 0,90 (Girard, 1988). Des exemples de tels produits sont donnés dans le Tableau 1 dans les catégories « salé-séché », « salé-séché-fumé » et « salé-fermenté-séché ».

I.1.3.3. DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION (DII)

La Déshydratation-Imprégnation par Immersion (DII) consiste à mettre un produit divisé en morceaux de petite taille en contact avec une solution concentrée en solutés. L'intérêt majeur de la DII vient, comme son nom l'indique, de la possibilité de coupler, dans une seule étape athermique, la déshydratation et l'imprégnation en solutés (sel, sucres, acides). Plus communément utilisée lors du confisage des fruits, la DII est proposée dans le cadre de ce travail de recherche comme une alternative pour saler et diminuer l'activité en eau des morceaux de viande.

Au cours de l'immersion, des transferts de matière ont lieu : l'eau et quelques solutés propres à la viande (comme l'acide lactique) migrent du produit vers la solution tandis que dans le même temps, les solutés pénètrent depuis la solution vers la viande (Figure 3 adaptée de Trystram (2007)).

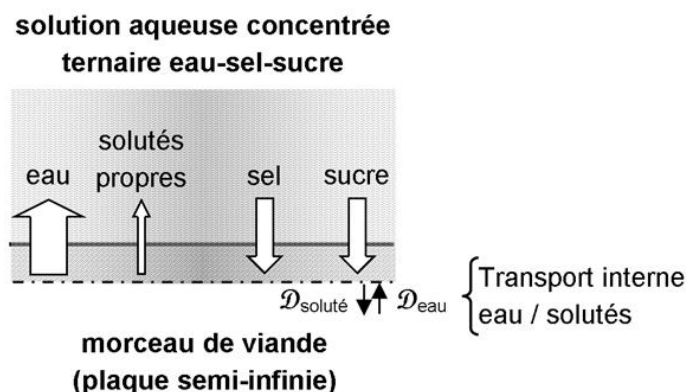


Figure 3. Représentation schématique des transferts de matière lors du traitement d'un morceau de viande par Déshydratation-Imprégnation par Immersion en solution ternaire eau-sel-sucre. Adapté de : Trystram (2007).

Dans le cadre de ce travail, la solution d'immersion est une solution ternaire eau-sel-sirop de glucose, le sirop de glucose étant un mélange de glucose, malto-dextrines et dextrines. L'utilisation de cette solution favorise la déshydratation de la viande par départ d'eau tout en limitant l'imprégnation en sel (Collignan & Raoult-Wack, 1994) grâce à la formation, à la surface des morceaux de viande, d'une couche-barrière constituée de dextrines de grande taille (Santchurn *et al.*, 2007).

Les transferts entre la solution et le produit à l'interface sont assurés par les différences de concentrations entre la solution d'immersion, concentrée en solutés, et la solution occluse contenue dans la matrice alimentaire, moins concentrée que la solution d'immersion. Le potentiel de transfert est limité par l'effet de couche limite. Cet effet peut être contrecarré d'une part par une bonne agitation des produits dans le bain afin de renouveler en permanence la solution en contact avec la surface du produit, et d'autre part par un ratio massique produit/solution adapté pour éviter une dilution trop importante de la solution d'immersion. Au sein de la viande, les transports croisés d'eau et de solutés (sel, sucre) sont régis par les diffusivités de matière exprimées en $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ et notées \mathcal{D}_{eau} et $\mathcal{D}_{\text{soluté}}$ dans la Figure 3. Ces diffusivités de matière apparaissent sous le terme \mathcal{D} dans l'expression des première et deuxième lois de Fick (Équations (1) et (2) respectivement) :

$$\vec{m} = -A \mathcal{D} \vec{\nabla} C \quad (1)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\text{div}(-\mathcal{D} \vec{\nabla} C) \quad (2)$$

La première loi, qui exprime le débit de matière diffusante en $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$ à travers une surface A en fonction d'un gradient de concentration ∇C , s'applique en régime permanent. La deuxième loi, qui s'applique sur un élément de surface infiniment petit (le divergent), est utilisée dans le cas d'un régime transitoire.

Ces mécanismes de diffusion ont leur importance pendant la DII mais aussi une fois le produit sorti de la solution d'immersion, alors que les concentrations continuent à évoluer (vers l'équilibre) au sein du produit.

En termes de barrières, la DII diminue l'activité en eau de la viande par déshydratation et par l'imprégnation en solutés osmo-dépresseurs, le sel et les sucres. De plus, l'incorporation de sel et de sucres formule le produit en vue d'une sélection des flores au cours de l'étape de fermentation.

I.1.4. ACIDIFICATION ET BIO-PROTECTION PAR FERMENTATION

La fermentation de la viande est utilisée depuis l'antiquité pour conserver la viande sans avoir recours à des infrastructures de réfrigération (Holzapfel *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 2002). Elle est réalisée par une flore microbienne jugée bénéfique qui colonise la surface ou la masse d'une viande formulée (sels, épices) pour conduire des transformations qui donnent au produit des caractéristiques organoleptiques bien définies tout en assurant sa stabilité microbiologique (Montel *et al.*, 1998). Cette flore qui se compose de bactéries lactiques, de coques Gram + catalase +, de levures et de moisissures, contribue à la stabilisation de la viande par deux barrières : l'acidification et la bio-protection. Ainsi, le développement de cette flore conduit à l'inactivation des microorganismes d'altération et des pathogènes (Marceau *et al.*, 2002; Ammor *et al.*, 2005).

Des exemples de produits carnés salés-séchés-fermentés sont présentés dans le Tableau 1. Bien que ces produits soient de plus en plus fabriqués à l'échelle industrielle, une production à l'échelle familiale ou artisanale persiste et bénéficie d'une image « terroir » très importante et responsable de la diversité des produits selon les régions et les pays. Notamment, l'étape de fermentation est encore souvent conduite comme une fermentation spontanée par la flore présente sur la viande et dans l'environnement de l'atelier de production, *a contrario* de l'utilisation de starters commerciaux (Ammor *et al.*, 2005; Lebert *et al.*, 2007a).

L'utilisation des méthodes moléculaires a amélioré la connaissance sur l'écologie complexe des produits carnés fermentés. Des études comme celles de Cocolin *et al.* (2011) ont permis de montrer que *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus sakei* sont les espèces de bactéries lactiques qui prédominent dans les procédés de fabrication des produits carnés fermentés.

I.1.4.1. ACIDIFICATION

La production d'acide lactique lors de la fermentation provoque l'acidification de la viande de 5,4-5,8, pH de la viande après maturation (Huff-Lonergan, 2010), à 5,5-4,6, pH en fin de fermentation du saucisson sec (Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007). Ceci correspond à des

teneurs en acide lactique total (D+L) en fin d'étape de fermentation comprises entre 0,85 et 1,30 % (p/p) (Solignat, 1999). La théorie des barrières prend alors tout son sens dans ces procédés comme le montre la Figure 4. En effet, l'intensité de l'acidification requise pour protéger le produit de l'altération est liée à l'activité en eau de celui-ci. Un produit, dont l'activité en eau a été diminuée par des étapes de salage et séchage, pourra être acidifié dans une moindre mesure tout assurant sa stabilité microbiologique et en évitant un goût acide trop prononcé qui pourrait déplaire au consommateur (Zukál & Incze, 2010).

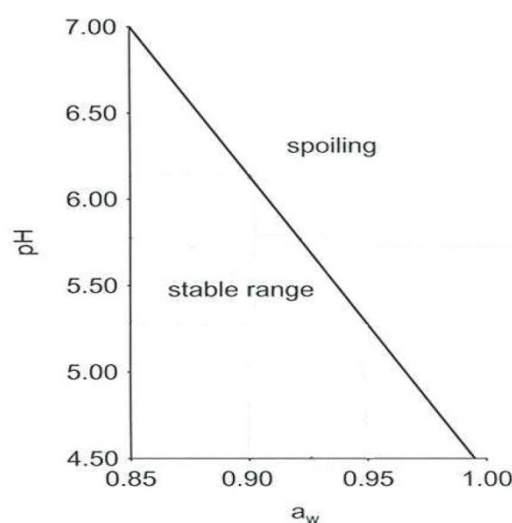


Figure 4. Domaine de stabilité microbiologique d'un produit carné en fonction de différentes combinaisons d'activité en eau et de pH. Source : Zukál & Incze (2010).

I.1.4.2. BIO-PROTECTION

La bio-protection est l'augmentation de la durée de conservation et de la sécurité microbiologique d'un produit par l'utilisation de la flore endogène et/ou de ses composés antimicrobiens (Stiles, 1996). Les bactéries lactiques deviennent la flore majoritaire au cours de l'étape de fermentation de la viande. Dans un produit de type saucisson sec, la population initiale est de 10^3 - 10^5 UFC/g et augmente pour atteindre 10^6 - 10^9 UFC/g en fin d'étape de fermentation (Coppola *et al.*, 2000; Garriga & Aymerich, 2007).

Dans l'établissement de cette barrière on retrouve l'importance de l'incorporation préalable de sel dans le produit. Comme l'explique Ruiz (2007), l'ajout de sel à hauteur de 4 % (p/p) ne diminue pas l'activité en eau suffisamment pour stabiliser complètement le produit mais joue un

rôle crucial dans la sélection des flores bénéfiques comme les bactéries lactiques par rapport aux flores d'altération qui sont moins tolérantes au sel.

I.1.4.3. PRODUITS FERMENTÉS NON-DIVISÉS

Une controverse existe en ce qui concerne la définition des produits carnés fermentés et le fait d'y inclure les produits faits de muscles entiers ou découpés en morceaux (Zeuthen, 2007). Lorsqu'il s'agit de classification, Campbell-Platt (1995), Zeuthen (2007), ou Santchurn *et al.* (2011), considèrent les produits non-divisés (jambons secs, *bresaola* italienne, *beef jerky* américain, etc.) comme étant des produits fermentés en argumentant qu'ils subissent des changements dus à des réactions enzymatiques, qui peuvent ou non être d'origine microbienne. Cependant, lorsqu'il est question de technologie des produits carnés fermentés, les discussions portent le plus souvent sur les produits de type saucisson sec, qu'ils soient fermentés de manière spontanée ou par incorporation de starters dans la mêlée.

Seules quelques rares études s'intéressent aux produits non-divisés en tant que produits fermentés. Mercier *et al.* (1989) mettent en évidence une phase d'acidification au cours du procédé de fabrication de la viande des Grisons ou *Bündnerfleisch*, spécialité suisse. Au cours de cette phase, la population de bactéries lactiques atteint 10^9 UFC/g et la teneur en acide D-lactique du produit augmente en surface de 1,35 g/kg (b.s.) à 7,93 g/kg (b.s.). Pinto *et al.* (2002) ont caractérisé le *charque* brésilien comme un produit fermenté en montrant que les staphylocoques coagulase – deviennent la flore majoritaire (84,2 %) dans le produit fini.

Outre la complexité inhérente au processus de fermentation (évolution de l'équilibre des flores, variété de schémas métaboliques produisant des composés caractéristiques), on comprend la difficulté de caractériser les produits non-divisés comme des produits fermentés par la difficulté d'échantillonnage de la surface sur laquelle se déroulent les phénomènes.

I.2. LACTOBACILLUS SAKEI

I.2.1. HABITAT ET CLASSIFICATION

Lactobacillus sakei, anciennement dénommé *Lactobacillus sake*, a été initialement mis en évidence comme une bactérie d'altération du saké, boisson fermentée à base de riz d'origine japonaise. *L. sakei* se retrouve naturellement dans les ensilages, la choucroute et le poisson fumé mais plus fréquemment dans les produits carnés.

En forme de bâtonnets courts regroupés par paires ou en courtes chaînes (Figure 5 d'après Champomier-Vergès *et al.* (2001)), *L. sakei* appartient au genre *Lactobacillus*, du groupe des bactéries lactiques hétéro-fermentaires facultatives (« groupe *Streptobacterium* » ou « groupe II »). Il s'agit d'une bacille immobile, Gram +, avec pourcentage de G-C de 42-44 % (liaisons guanine-cytosine de l'ADN) (Larpent, 1996). *L. sakei* possède une pseudu-catalase dont l'activité dépend de la présence d'hème (Chaillou *et al.*, 2005).

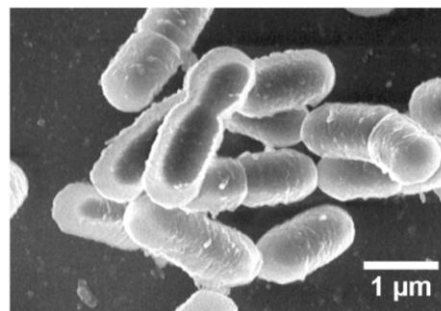


Figure 5. Photographie en microscopie électronique à balayage de *Lactobacillus sakei* 23K en croissance à 30 °C. Source : Champomier-Vergès *et al.* (2001).

I.2.2. MÉTABOLISME

I.2.2.1. MÉTABOLISME DES GLUCIDES

L. sakei métabolise les hexoses en acide lactique par voie homo-fermentaire (dite aussi d'Embden-Meyerhof-Parnas) et peut aussi métaboliser les pentoses par voie hétéro-fermentaire (Figure 6 adaptée de Larpent (1996)) pour produire de l'ATP.

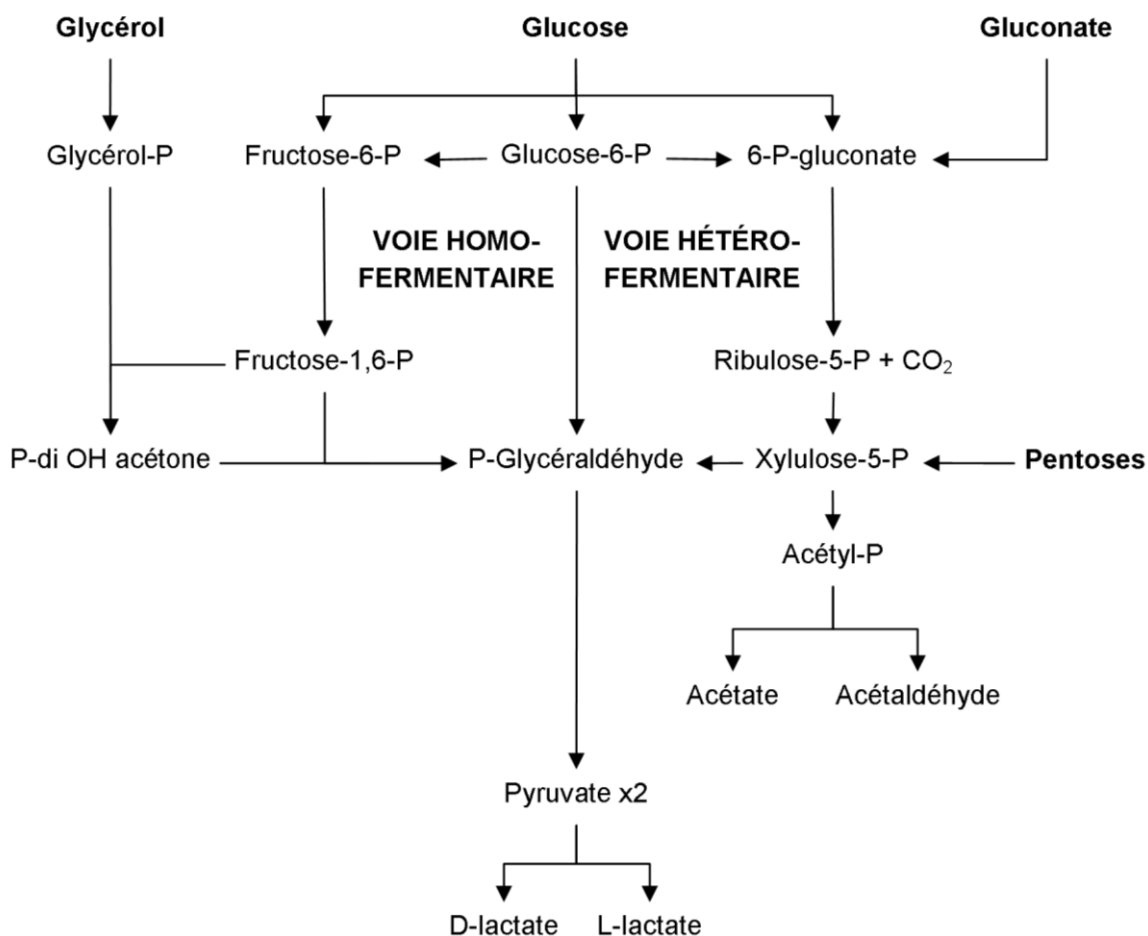


Figure 6. Schéma succinct des principales voies fermentaires des *Lactobacillus*. Adapté de : Larpent (1996).

L. sakei utilise différents mécanismes de transport (dont le système de phosphotransférase PTS, pour « Phospho-Transferase System » en anglais) pour acheminer les glucides depuis le milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule et jusqu'à la prise en charge dans une voie métabolique. *L. sakei* est ainsi capable de métaboliser une importante variété de glucides : le glucose, l'arabinose, le fructose, le galactose, le lactose, le mannose, le mélibiose, le ribose, le saccharose, le tréhalose, le gluconate et le N-acétylglucosamine (Champomier *et al.*, 1987; Lauret *et al.*, 1996; Champomier-Vergès *et al.*, 2001).

Le métabolisme des glucides conduit à la production des deux isomères D- et L- de l'acide lactique. Cependant, seule la L-lactate déshydrogénase, enzyme catalysant la conversion du pyruvate en L-lactate, est présente chez *L. sakei*. C'est du fait de la présence d'une lactate

racémase, enzyme qui convertit l'isomère L- en D-, que des proportions équivalentes des deux isomères sont obtenues (Champomier-Vergès *et al.*, 2001; Goffin *et al.*, 2005).

I.2.2.2. BESOINS NUTRITIONNELS

L. sakei fait partie de la flore endogène de la viande crue et devient la flore dominante lorsque la viande est stockée sous vide. Cette espèce est communément utilisée en Europe Occidentale comme ferment dans la fabrication de saucisses séchées (Champomier-Vergès *et al.*, 2001). Du fait de son adaptation au milieu viande, les besoins nutritionnels de *L. sakei* sont très stricts. Ces besoins nutritionnels ont été analysés par Lauret *et al.* (1996) et Møretrø *et al.* (1998) et il en a résulté la mise au point de milieux de culture spécifiques à *L. sakei*, le MCD et le DML respectivement, dont les compositions sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Composition des milieux de culture MCD (Lauret *et al.*, 1996) et DML (Møretrø *et al.*, 1998) spécifiques à la croissance de *Lactobacillus sakei*.

Composé (g/l)	MCD	DML	Acides aminés (mg/l)	MCD	DML
Acétate de sodium	2	-	Glycine	50	100
Acide succinique	-	11,9	L-Asparagine	50	400
Tween 80	1	0,55	L-Tryptophane	50	100
D(+)-glucose	5	10	L-Sérine	50	80
Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O	1,75	-	L-Alanine	50	160
KH ₂ PO ₄	-	1	L-Phénylalanine	50	40
KCl	0,75	-	L-Histidine	50	100
MnSO ₄	0,008	0,015	L-Isoleucine	50	50
MgSO ₄	0,2	0,15	L-Leucine	50	60
Vitamines (mg/l)			L-Lysine	50	100
Acide p-aminobenzoïque	0,4	-	L-Méthionine	50	25
Pyridoxal	0,5	0,5	L-Proline	50	40
Acide nicotinique	1	1	L-Thréonine	50	50
Acide folique	0,2	0,1	L-Valine	50	60
Pantothénate de calcium	1	1	L-Arginine	50	50
Riboflavine	1	0,5	L-Tyrosine	50	40
Thiamine	1	1	L-Cystéine	50	200
D-Biotine	-	0,01	L-Glutamine	50	300
Bases azotées (mg/l)					
Adénine	5	25			
Guanine	10	-			
Uracile	10	25			
Xanthine	-	25			

I.2.2.3. AUTRES ACTIVITÉS MÉTABOLIQUES

Certaines souches de *L. sakei* sont capables de produire des exo-polysaccharides (EPS) (Champomier-Vergès *et al.*, 2001). Dans le cas de la viande, la production d'EPS est plutôt considérée comme un défaut car elle constitue une altération du produit (poissage).

Les activités protéolytique et lipolytique jouent un rôle important dans le développement des qualités organoleptiques des produits fermentés (Champomier-Vergès *et al.*, 2001).

I.2.3. ADAPTATION AU MILIEU VIANDE

La viande est une matrice solide et pauvre en glucides dans laquelle les nutriments ne sont pas aussi disponibles que dans un aliment liquide comme le lait. S'ajoutent à cela des stress issus des procédés de transformation : réfrigération, séchage, salage, présence d'acides organiques, stockage sous atmosphère modifiée, etc. L'adaptation évolutive de *L. sakei* à cet environnement, qui lui permet d'être compétitive par rapport aux autres flores, se fait par l'intermédiaire d'une série de mécanismes mis en évidence par des études en biologie moléculaire (Hüfner *et al.*, 2007; Fadda *et al.*, 2010) qui font suite à la publication du génome de *L. sakei* par Chaillou *et al.* (2005). Certains de ces mécanismes d'adaptation sont détaillés ci-après.

I.2.3.1. TEMPÉRATURE

Selon Marceau *et al.* (2003), *L. sakei* 23K possède une température optimale de croissance de 30 °C mais peut croître à 4 °C. Selon Leroy & De Vuyst (1999b) la température optimale de croissance de *L. sakei* CTC 494 se situe entre 20 et 25 °C et la croissance a encore lieu à 35 °C.

La synthèse de « heat-shock proteins », lesquelles permettent de résister à l'élévation de la température, ont été mises en évidence chez *L. sakei* (Champomier-Vergès *et al.*, 2001). En ce qui concerne l'abaissement de la température, la résistance se fait dans un premier temps par l'accumulation de solutés protecteurs tels que la bétaïne et la carnitine (Chaillou *et al.*, 2005) mais aussi par une combinaison de mécanismes de modification des voies métaboliques

(Marceau *et al.*, 2004). Certains de ces moyens de lutte contre le stress thermique sont aussi sollicités pour lutter contre le stress osmotique.

I.2.3.2. STRESS OSMOTIQUE

La tolérance de *L. sakei* au stress osmotique est due à sa capacité à accumuler efficacement des molécules osmo-protectrices comme la glycine-bétaïne ou la carnitine (Chaillou *et al.*, 2005) qui permettent de maintenir la turgescence de la cellule.

Le soluté osmo-dépresseur le plus commun dans les produits carnés fermentés est le sel. Ammor *et al.* (2005) montrent que les 36 souches de *L. sakei* isolées de produits carnés peuvent croître à une teneur en sel de 4 % (p/p) et que 20 souches sur 36 croissent à une teneur de 6,5 % (p/p). Cette proportion élevée de souches pouvant encore croître à 6,5 % (p/p) de sel illustre la bonne adaptation de *L. sakei* aux conditions rencontrées dans la fabrication des produits carnés de salaison. L'effet du sel est toujours associé au stress osmotique et seules quelques études suggèrent l'existence d'une toxicité spécifiquement due à la molécule de sel outre sa propriété d'osmo-dépresseur (Tempest & Meers, 1968; Neysens *et al.*, 2003; Theys *et al.*, 2010).

I.2.3.3. ACIDE LACTIQUE

L'effet de l'acide lactique sur le métabolisme de *L. sakei* est décrit dans les revues de Brul & Coote (1999) et Van de Guchte *et al.* (2002). L'acide lactique est un acide faible et est par conséquent partiellement dissocié au pH de la viande, par opposition à un acide fort comme l'acide chlorhydrique (HCl) qui se dissocie complètement (Équations (3) et (4)). L'équilibre entre la forme non-dissociée (CH₃-CHOH-COOH ou LaH) et la forme dissociée (CH₃-CHOH-COO⁻ ou La⁻) se met en place en fonction de la valeur du pH. Lorsque le pH est égal au pKa du couple LaH/La⁻, soit 3,90, il y a autant de LaH que de La⁻. Lorsque le pH est inférieur au pKa, il y a plus de LaH que de La⁻ et inversement lorsque le pH est supérieur au pKa.



L. sakei produit de l'acide lactique qui s'accumule dans l'espace extracellulaire. Cet acide diffuse sous sa forme non-dissociée (LaH) de manière passive à travers la membrane cellulaire et, une fois dans le cytoplasme, du fait du pH intracellulaire supérieur au pKa, se dissocie selon l'équation (4). L'accumulation de protons à l'intérieur de la cellule abaisse le pH intracellulaire et déstabilise le gradient de pH transmembranaire qui contribue à l'installation de la force proton-motrice laquelle participe dans de nombreux phénomènes de transport transmembranaire. De plus, l'acidification du cytoplasme inhibe l'activité de certaines enzymes, et dénature les protéines et l'ADN. Enfin, la forme La^- aurait aussi un effet négatif sur la physiologie cellulaire (Presser *et al.*, 1997).

Cependant, la préservation des aliments par fermentation lactique est basée sur les mécanismes d'acido-tolérance des bactéries lactiques contre l'acide qu'elles mêmes produisent, qui leur confèrent un avantage adaptatif par rapport aux autres bactéries. L'acido-tolérance pendant la phase exponentielle de croissance peut être accrue en pré-cultivant les bactéries à un pH acide pour les adapter. Pendant la phase stationnaire, l'acido-tolérance augmente faisant partie de la réponse généralisée au stress. Amrane & Prigent (1999) mesurent pour *Lactobacillus helveticus* une concentration d'inhibition de la forme non-dissociée de l'acide lactique de 0,9 % (p/v). Leroy & De Vuyst (1999a) donnent une valeur de 1,7 % (p/v) de concentration en acide lactique total à pH 5,5 en bouillon MRS comme étant la concentration d'inhibition de la croissance de *L. sakei*.

I.2.3.4. CATABOLISME DE L'ARGININE

Le catabolisme de l'arginine via la voie métabolique de l'arginine-désaminase est, chez *L. sakei*, une voie auxiliaire pour la production d'ATP. Cette voie métabolique est déclenchée avec l'entrée en phase stationnaire et est régulée en fonction du pH (Rimaux *et al.*, 2011) ainsi que par la concentration en glucose du milieu. Lorsque la concentration en glucose du milieu est supérieure à 0,001 mol/l la voie métabolique n'est pas enclenchée (Montel & Champomier-

Vergès, 1987). Cette voie joue un rôle important dans la survie de *L. sakei* en conditions d'épuisement du glucose du milieu et contribue ainsi à sa compétitivité dans le milieu viande.

I.2.3.5. PRODUCTION DE BACTÉRIOCINES

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par certaines espèces bactériennes dont l'action antibactérienne est orientée vers des espèces qui peuvent être proches de la bactérie qui les produit. La sakacine A, sakacine P et la lactocine S sont trois des bactériocines isolées chez *L. sakei* (Tableau 4 d'après Champomier-Vergès *et al.* (2001)).

Tableau 4. Caractéristiques biochimiques et spectre d'action des bactériocines décrites chez *Lactobacillus sakei*. Source : Champomier-Vergès *et al.* (2001).

Bacteriocin	Producers	Biochemical characteristics	Inhibitory spectrum	References
sakacin A	<i>L. sakei</i> L706	class IIa bacteriocin 4309 Da 41 amino acids hydrophobic identical to curvacin A produced by <i>L. curvatus</i> LTH1174	<i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactococcus cremoris</i>	[1,11,18,39]
sakacin P (also called sakacin 674)	<i>L. sakei</i> LTH673 <i>L. sakei</i> L674	class IIa bacteriocin 4436 Da 43 amino acids hydrophobic	<i>L. curvatus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>L. sakei</i> <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>L. fructivorans</i> , <i>Listeria ivanovii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Carnobacterium</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i>	[18,22,40,53]
lactocin S (also called sakacin M)	<i>L. sakei</i> L45 <i>L. sakei</i> 148	antibiotic 3769 Da 33 amino acids 50% nonpolar amino acids	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp.	[18,43,48,49]

[1] Axelsson *et al.* (1998), [11] Diep *et al.* (2000), [18] Hammes & Hertel (1998), [22] Holck *et al.* (1994), [39] Silla Santos (1998), [40] Sanz & Toldrá (1997), [48] Stentz *et al.* (2000)[49] Tichaczek *et al.* (1994), [53] Vogel *et al.* (1991).

Leroy & De Vuyst (1999b) ont étudié la sakacine K, produite par *L. sakei* CTC 494 et qui agit contre *Listeria*. Ils ont montré que la production de cette bactériocine est liée à celle de la biomasse mais sous la dépendance de certains facteurs environnementaux. Le pH optimal pour la production de cette bactériocine est de 5,0 alors que le pH optimal de croissance est de 6,0. *L. sakei* peut se développer à 35 °C mais sans produire de bactériocine. Dortu *et al.* (2009) relèvent des résultats semblables sur la sakacine G produite par la souche CWBI-B1365 en notant des conditions optimales de production de 25 °C et un pH de 5,5.

I.2.3.6. NOTION DE « CROSS-PROTECTION » ET ADAPTATION À LONG TERME

Van de Guchte *et al.* (2002) abordent la notion de « cross-protection » c'est-à-dire la mise en œuvre de mécanismes de réponse adaptative à court et long termes à des stress combinés. Dans cette étude les auteurs passent en revue des travaux démontrant que l'épuisement du glucose entraîne une résistance accrue à d'autres stress environnementaux comme le stress thermique, oxydatif, acide, ou osmotique. Cette propriété de *L. sakei* est aussi décrite dans la revue de Labadie (1999). Hüfner & Hertel (2008) montrent qu'il est possible de conditionner *L. sakei* en appliquant des stress environnementaux pour la préparer à un environnement donné et obtenir de meilleurs résultats en termes de croissance. Marceau *et al.* (2003) étudient la possibilité de cultiver une souche dans des conditions sub-optimales en vue d'augmenter sa survie.

I.3. MODÉLISATION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE

I.3.1. CROISSANCE MICROBIENNE ET MICROBIOLOGIE PRÉVISIONNELLE

L'évolution d'une population microbienne en fonction du temps est classiquement représentée par le logarithme népérien de la population en fonction du temps, généralement exprimé en heures (Figure 7). La phase de déclin étant rarement étudiée, la croissance microbienne est considérée comme une sigmoïde composée de trois phases : la phase de latence, la phase exponentielle et la phase stationnaire. Pour caractériser l'ensemble de la sigmoïde les paramètres nécessaires sont : la population initiale ($\ln N(t) = \ln N_0$ quand $t = 0$), la population maximale ($\ln N(t) = \ln N_{\max}$ quand $t = \infty$), la durée de la phase de latence (λ) et la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) ou sa transformation en temps de génération $t_g = \ln(2)/\mu_{\max}$. Dans la suite, $y(t) = \ln N(t)$ sera parfois utilisé pour simplifier les écritures.

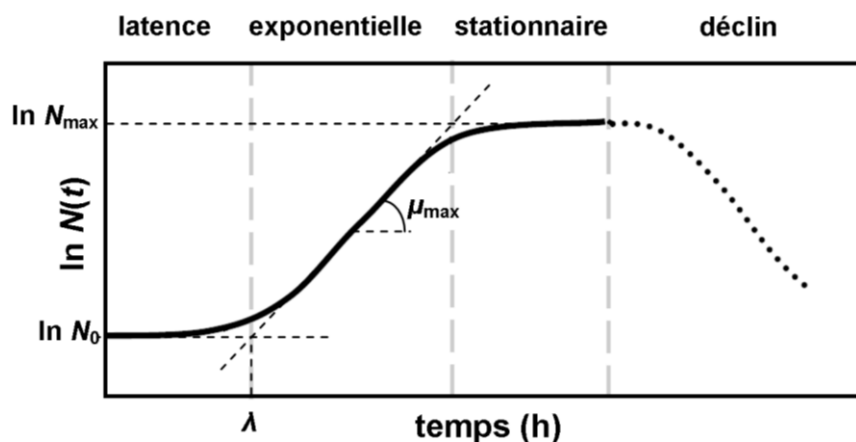


Figure 7. Forme typique d'une courbe de croissance microbienne et paramètres pris en compte dans l'établissement des modèles primaires : la population initiale ($\ln N_0$), la population maximale ($\ln N_{\max}$), la durée de la phase de latence (λ) et la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}).

La discipline de microbiologie prévisionnelle, visant à modéliser l'évolution d'une population microbienne en fonction du temps, est basée sur l'hypothèse que la réponse d'un microorganisme est prédictible et reproductible en fonction des facteurs environnementaux (Ross & McMeekin, 2003). Bien que d'autres existent, la classification la plus avérée des différents modèles est celle de Whiting (1995) qui propose de les diviser en modèles primaires,

secondaires et tertiaires. Les modèles primaires décrivent les changements dans le nombre de microorganismes au cours du temps. Les modèles secondaires donnent la dépendance des paramètres du modèle primaire aux facteurs environnementaux (température, pH, activité en eau, etc.). Les modèles primaires et secondaires seront commentés de manière plus détaillée ci-après. Les modèles tertiaires regroupent modèles primaire et secondaire dans un modèle global au travers d'interfaces-utilisateur telles le Pathogen Modeling Program (Whiting, 1995), ComBase (Baranyi & Tamplin, 2004) ou Sym'Previus (Leporq *et al.*, 2005). Il est important de signaler que ces initiatives de centralisation de l'information et de construction de bases de données de modèles de prédiction de la croissance microbienne sont une preuve de la richesse et de la complexité de la discipline mais aussi de l'intérêt qu'elle présente aussi bien dans le monde de la recherche que dans celui de l'industrie.

I.3.2. MODÈLES PRIMAIRES

I.3.2.1. MODÈLE DE GOMPERTZ

Au début de l'essor de la microbiologie prévisionnelle, le modèle de Gompertz, tel qu'il a été reparamétré par Zwietering *et al.* (1990) (Équation (5)), est devenu le modèle primaire de prédilection. Les paramètres du modèle sont au nombre de 4 : le logarithme népérien de la population initiale (y_0), le logarithme népérien de la population maximale (y_{\max}), la durée de la phase de latence (λ) et la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}).

$$y(t) = y_0 + (y_{\max} - y_0) \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} e(\lambda - t)}{y_{\max} - y_0} + 1 \right] \right\} \quad (5)$$

Le modèle de Gompertz a été très employé pour sa parcimonie et sa qualité d'ajustement sur les données expérimentales, mais a été progressivement abandonné en raison de son empirisme (McDonald & Sun, 1999). Selon Baranyi & Roberts (1995), le modèle de Gompertz n'ayant aucun fondement mécanistique, il ne devrait pas être appelé « modèle » car il s'agit simplement d'une fonction qui s'ajuste bien sur les données de croissance microbienne. Comme le montre la Figure 8, la courbe en forme de S n'est pas en accord avec la définition de la phase exponentielle comme

étant la phase durant laquelle les cellules se multiplient à une vitesse constante. La vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) qui décrit la phase exponentielle, est définie comme étant la pente de la tangente au point d'inflexion. Avec cette définition, la vitesse de croissance avant le point d'inflexion est inférieure à μ_{\max} et supérieure après le point d'inflexion.

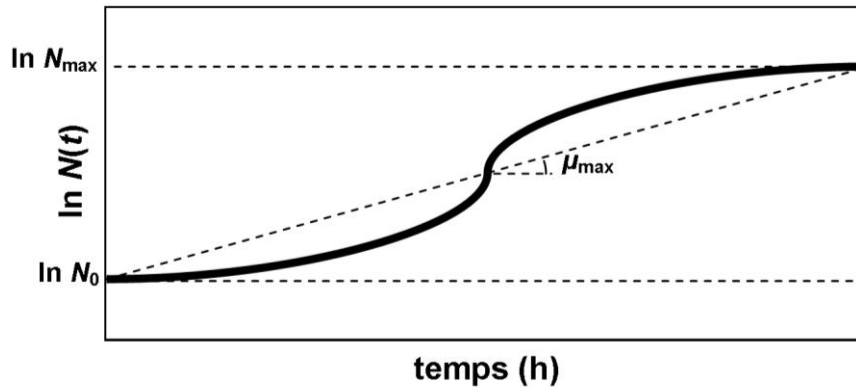


Figure 8. Forme sigmoïdale du modèle de Gompertz lors de la phase exponentielle de croissance.

I.3.2.2. MODÈLE TRI-LINÉAIRE

Dans le souci de décrire la phase de croissance exponentielle comme une droite, le modèle le plus simple et robuste est le modèle linéaire en 3 phases de Buchanan *et al.* (1997) présenté dans sa forme différentielle dans le système d'équations (6).

$$\frac{dN(t)}{N(t)dt} = \begin{cases} 0, & t \leq \lambda \text{ avec } \ln N(t) = \ln N_0 \\ \mu_{\max}, & \lambda < t < t_{\max} \\ 0, & t \geq t_{\max} \text{ avec } \ln N(t) = \ln N_{\max} \end{cases} \quad (6)$$

Ainsi, ce modèle se résume à une première droite horizontale à $\ln N_0$ pour la phase de latence pendant laquelle les cellules ne se divisent pas, puis une droite de pente μ_{\max} pour la phase exponentielle et enfin une seconde droite horizontale à $\ln N_{\max}$ correspondant à la phase stationnaire. Buchanan *et al.* (1997) donnent une série d'arguments pour justifier de la structure de ce modèle et notamment des transitions abruptes entre phases. En ce qui concerne la transition entre phase de latence et phase exponentielle, ils font l'hypothèse d'une population bactérienne dans laquelle toutes les cellules sortiraient de la phase de latence en même temps.

Ils montrent aussi comment ce modèle tri-linéaire peut se transformer en un modèle plus « classique » avec une transition lisse entre la phase de latence et la phase exponentielle en tenant compte de la variabilité intra-population. En ce qui concerne la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire, les auteurs argumentent que dans le cas de cultures en milieu liquide agité, l'expérience montre que la transition est effectivement plutôt abrupte. Pragmatiquement, ils postulent que la phase stationnaire n'a pas grand intérêt dans l'étude des flores pathogènes et d'altération car si elle est atteinte les niveaux de contamination seraient tels que le produit serait largement inapte à la consommation.

I.3.2.3. MODÈLE LOGISTIQUE AVEC DÉLAI ET RUPTURE

Rosso *et al.* (1996) proposent un modèle dit logistique avec délai et rupture, présenté dans sa forme différentielle dans le système d'équations (7) :

$$\frac{dN(t)}{N(t)dt} = \begin{cases} 0, & t \leq \lambda \text{ avec } \ln N(t) = \ln N_0 \\ \mu_{\max} \left(1 - \frac{N(t)}{N_{\max}}\right), & t > \lambda \end{cases} \quad (7)$$

De la même façon que dans le modèle tri-linéaire, la phase exponentielle est décrite par une droite et la transition entre phase de latence et phase exponentielle est abrupte lorsque t devient égal à λ . Par contre, ce modèle utilise la fonction d'inhibition logistique pour construire une transition lisse entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. Cette fonction d'inhibition tend vers 1 pour un $N(t)$ petit par rapport à N_{\max} et tend vers 0 pour un $N(t)$ proche de N_{\max} .

I.3.2.4. MODÈLE DE BARANYI ET ROBERTS

Le modèle primaire le plus utilisé aujourd'hui est celui de Baranyi & Roberts (1994), présenté dans sa forme différentielle dans les équations (8), (9) et (10) :

$$\frac{dN(t)}{N(t)dt} = \mu_{\max} a(t) u(t) \quad (8)$$

$$a(t) = \frac{q_0}{q_0 + \exp(-\mu_{\max} t)} \quad (9)$$

$$u(t) = 1 - \frac{N(t)}{N_{\max}} \quad (10)$$

Le premier terme à droite de l'égalité, la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}), est responsable, comme dans le modèle tri-linéaire et le modèle de Rosso *et al.* (1996), de la linéarité de la phase exponentielle. Le terme $u(t)$ est la fonction d'inhibition logistique (Équation (10)), présente dans le modèle de Rosso *et al.* (1996) et qui est responsable de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Enfin, le terme $a(t)$ est la fonction d'ajustement, comprise comme $u(t)$ entre 0 et 1, et responsable de la transition de la phase de latence à la phase exponentielle. Dans cette fonction d'ajustement, le paramètre q_0 qui constitue la base mécanistique du modèle de Baranyi & Roberts (1994), décrit l'aptitude des cellules à commencer à se diviser (Baranyi & Roberts, 1994), ou selon les mots de Muñoz-Cuevas *et al.* (2010), le « travail à faire » par les cellules qui arrivent dans un nouvel environnement avant de pouvoir commencer à se diviser. La durée de la phase de latence (λ), non-explicite dans l'écriture du modèle se retrouve au travers de ce paramètre q_0 selon la relation (11) dans laquelle h_0 et a_0 sont des transformations de q_0 :

$$h_0 = \mu_{\max} \lambda = \ln(1 + 1/q_0) = -\ln(a_0) \quad (11)$$

La forme intégrée du modèle de Baranyi & Roberts (1994) est présentée dans les équations (12) et (13) exprimant ainsi l'évolution de $y(t)$ en fonction de 4 paramètres : le logarithme népérien de la population initiale (y_0), le logarithme népérien de la population maximale (y_{\max}), l'état physiologique des cellules à l'instant initial (q_0) et la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{\exp[\mu_{\max} A(t)] - 1}{\exp(y_{\max} - y_0)} \right\} \quad (12)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left[\frac{\exp(-\mu_{\max} t) + q_0}{1 + q_0} \right] \quad (13)$$

Outre sa bonne capacité d'ajustement et ses fondements mécanistiques, le modèle de Baranyi & Roberts (1994) présente l'avantage, comme le précisent Grijspeerdt & Vanrolleghem (1999), de constituer un modèle dynamique capable de prédire la croissance dans un environnement variable au travers de la dépendance de μ_{\max} à l'environnement (Baranyi & Roberts, 1994).

I.3.2.5. MODÈLE DE HUANG

Depuis une structure dynamique commune (Équation (14)) avec le modèle de Baranyi & Roberts (1994), Huang (2008) a conçu un modèle en gardant la fonction d'inhibition logistique (Équation (16)) pour la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire, et en utilisant une nouvelle fonction d'ajustement (Équation (15)) pour la transition entre phase de latence et phase exponentielle.

$$\frac{dN(t)}{N(t)dt} = \mu_{\max} b(t) u(t) \quad (14)$$

$$b(t) = \frac{1}{1 + \exp[-\alpha(t - \lambda)]} \quad (15)$$

$$u(t) = 1 - \frac{N(t)}{N_{\max}} \quad (16)$$

La forme intégrée du modèle de Huang (2008) est présentée dans les équations (17) et (18) exprimant ainsi l'évolution de $y(t)$ en fonction de 5 paramètres : le logarithme népérien de la population initiale (y_0), le logarithme népérien de la population maximale (y_{\max}), un paramètre de courbure (α), la durée de la phase de latence (λ) et la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}).

$$y(t) = y_0 + y_{\max} - \ln\{\exp(y_0) + [\exp(-\mu_{\max}B(t))][\exp(y_{\max}) - \exp(y_0)]\} \quad (17)$$

$$B(t) = t + \frac{1}{\alpha} \ln \left\{ \frac{1 + \exp[-\alpha(t - \lambda)]}{1 + \exp(\alpha\lambda)} \right\} \quad (18)$$

I.3.3. MODÈLES SECONDAIRES

Les modèles secondaires consistent à prédire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres du modèle primaire. Les paramètres du modèle primaire décrits par des modèles secondaires sont dans une grande mesure μ_{\max} (ou sa transformation en t_g), suivi de λ , et beaucoup plus rarement N_{\max} (Wijtzes *et al.*, 1995). En ce qui concerne les facteurs environnementaux, étant donné la complexité des situations réelles, il n'est pas possible d'être exhaustif dans le choix des facteurs et chaque équipe de recherche fait une sélection des facteurs

importants selon le cadre de l'étude. Les plus fréquemment étudiés sont : la température, le pH et l'activité en eau, mais il peut aussi s'agir de la teneur en sel, de la teneur en acide lactique, du potentiel redox ou de la quantité d'oxygène ou de dioxyde de carbone dissout. Il existe deux approches dans l'élaboration des modèles secondaires (Figure 9).

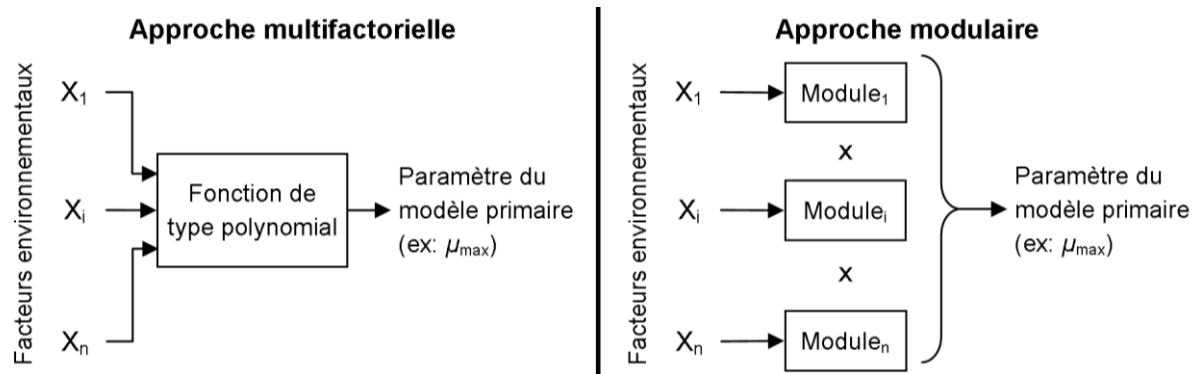


Figure 9. Approches de modélisation de l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres du modèle primaire de croissance microbienne.

I.3.3.1. APPROCHE MULTIFACTORIELLE

L'approche multifactorielle consiste à décrire simultanément et de manière additive l'influence des facteurs environnementaux (notés X_i) à l'aide d'une fonction de type polynomial prenant en compte les interactions entre les différents facteurs (Équation (19)).

$$\mu_{\max} = \sum a_i X_i^2 + \sum b_i X_i + \sum_{j=i} c_{ij} (X_i X_j) + d \quad (19)$$

I.3.3.2. APPROCHE MODULAIRE

L'approche modulaire consiste à modéliser individuellement l'effet de chaque facteur environnemental à l'aide de modules simples puis de multiplier les effets de l'ensemble des facteurs pour obtenir un modèle général. Cette approche est compatible avec les préconisations de Wilson *et al.* (2002) de mettre en œuvre des modèles ayant un fondement biologique et un nombre limité de paramètres, et permettant de décrire facilement l'influence de plusieurs facteurs.

Elle a d'abord été formalisée sous la forme du γ -concept (Équations (20) et (21)) par Zwietering *et al.* (1996). Les auteurs se sont basés sur la théorie des barrières pour décrire l'influence de

l'environnement (E) sur μ_{\max} à partir d'un certain μ_{\max} optimal ($\mu_{\max, \text{opt}}$) en multipliant les effets des différents facteurs (X_i) qui agissent de manière indépendante selon des fonctions- γ , adimensionnelles et comprises entre 0 et 1.

$$\mu_{\max} = \mu_{\max, \text{opt}} \gamma(E) \quad (20)$$

$$\gamma(E) = \prod \gamma(X_i) \quad (21)$$

Pour construire les différentes fonctions- γ , Zwietering *et al.* (1996) utilisent notamment des modèles de type racine carrée. Ce type de modèle a d'abord été proposé par Ratkowsky *et al.* (1982) pour décrire l'effet de la température (T) sur la racine carrée de μ_{\max} avec a la pente de la droite et T_0 une température conceptuelle sans aucune signification biologique (Équation (22)) :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = a(T - T_0) \quad (22)$$

La température T_0 a été rapidement remplacée par T_{\min} la température minimale de croissance et le modèle a été étendu pour prédire l'effet d'autres facteurs environnementaux sur μ_{\max} sous une forme plus générale avec X un facteur donné, les indices « min » et « opt » donnant respectivement les valeurs minimales et optimales de croissance et n un paramètre de forme (Système d'équations (23)) (Augustin *et al.*, 2005)).

$$SR_n(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \left(\frac{X - X_{\min}}{X_{\text{opt}} - X_{\min}} \right)^n, & X > X_{\min} \end{cases} \quad (23)$$

Pour les substances inhibitrices, Dalgaard *et al.* (1994) proposent d'utiliser le modèle racine carrée avec $n = 2$, en remplaçant X_{opt} par 0 et en renommant X_{\min} par MIC (pour « Minimal Inhibitory Concentration » en anglais). Coroller *et al.* (2005) proposent de décrire l'effet des substances inhibitrices différemment (Système d'équations (24)).

$$IS_n(X) = \begin{cases} 0, & X \geq MIC \\ 1 - \left(\frac{X}{MIC} \right)^n, & X < MIC \end{cases} \quad (24)$$

Le modèle cardinal, décrit par Augustin & Carlier (2000), est présenté dans le système d'équations (25) dans lequel les indices « min », « max », et « opt » donnent respectivement les valeurs minimales, maximales et optimales de croissance pour un facteur X donné et n est un paramètre de forme.

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max})(X - X_{\min})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\min})^{n-1} \{ (X_{\text{opt}} - X_{\min})(X - X_{\text{opt}}) - (X_{\text{opt}} - X_{\max})[(n-1)X_{\text{opt}} + X_{\min} - nX] \}}, & X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0, & X \geq X_{\max} \end{cases} \quad (25)$$

I.3.3.3. EXEMPLES D'UTILISATION DE MODÈLES SECONDAIRES

Le Tableau 5 présente des exemples d'utilisation des différents modèles secondaires.

Tableau 5. Exemples d'utilisation de modèles secondaires.

Référence	Microorganisme étudié	Paramètres du modèle primaire décrits	Modèle	Facteurs environnementaux étudiés
Van Impe <i>et al.</i> (1992)	–	$\sqrt{(\mu_{\max})}$	Ratkowsky étendu	Température
Passos <i>et al.</i> (1994)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	μ_{\max}	Fonctions d'inhibition type logistique	pH, NaCl, acide lactique, glucose
Presser <i>et al.</i> (1997)	<i>Escherichia coli</i>	$\sqrt{(\mu_{\max})}$	Ratkowsky étendu	Température, pH, a_w , acide lactique
Devlieghere <i>et al.</i> (1998)	<i>Lactobacillus sakei</i>	$\ln(1+\lambda)$, μ_{\max}	Polynôme	Température, CO ₂
Gänzle <i>et al.</i> (1998)	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Candida milleri</i>	μ_{\max}	γ -concept, Ratkowsky étendu pour la température, CM ₁ pour le pH et la force ionique, IS _n pour les acides	Température, pH, force ionique, acides
Geeraerd <i>et al.</i> (1998)	–	λ , μ_{\max} , N_0	Réseaux de neurones artificiels	Température, pH, NaCl
Lebert <i>et al.</i> (1998)	<i>Listeria monocytogenes</i>	$\log(1/\lambda)$, $\log(\mu_{\max})$	Polynôme	Température, pH, a_w
Augustin & Carlier (2000)	<i>Listeria monocytogenes</i>	μ_{\max}	γ -concept, CM ₁ pour le pH, CM ₂ pour la température et l' a_w , SR ₂ pour les substances inhibitrices	Température, pH, a_w , substances inhibitrices
Devlieghere <i>et al.</i> (2000)	<i>Lactobacillus sakei</i>	$\sqrt{(\lambda)}$, $\sqrt{(\mu_{\max})}$	Polynôme / Ratkowsky étendu	Température, a_w , lactate de sodium, CO ₂
Lebert <i>et al.</i> (2000)	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>	λ , t_g	Polynôme	Température, pH, NaCl
Wijtzes <i>et al.</i> (2001)	<i>Lactobacillus curvatus</i>	μ_{\max}	γ -concept	Température, pH, a_w

I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le Marc <i>et al.</i> (2002)	<i>Listeria monocytogenes</i>	μ_{\max}	γ -concept, CM ₂ pour la température, CM ₁ pour le pH, IS _{0.5} pour l'acide lactique + interactions	Température, pH, acide lactique
Leroy & De Vuyst (2003)	<i>Lactobacillus sakei</i>	μ_{\max}	γ -concept, CM ₂ pour la température, CM ₁ pour le pH, SR _n pour l'acide lactique	Température, pH, acide lactique
Messens <i>et al.</i> (2003)	<i>Lactobacillus curvatus</i>	μ_{\max}	γ -concept, CM ₂ pour la température, CM ₁ pour le pH	Température, pH
Ross <i>et al.</i> (2003)	<i>Escherichia coli</i>	$\sqrt{(\mu_{\max})}$	Ratkowsky étendu basé sur Presser <i>et al.</i> (1997)	Température, pH, a_w , acide lactique
Geeraerd <i>et al.</i> (2004)	<i>Lactobacillus sakei</i>	$\sqrt{(\lambda)}, \sqrt{(\mu_{\max})}$	Polynôme	Température, a_w , lactate de sodium, CO ₂
Pinon <i>et al.</i> (2004)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , etc.	μ_{\max}	γ -concept, CM ₁ pour le pH, CM ₂ pour la température et l' a_w , Ratkowsky	Température, pH, a_w
Amézquita <i>et al.</i> (2005)	<i>Clostridium perfringens</i>	$\sqrt{(\mu_{\max})}$		Température
Coroller <i>et al.</i> (2005)	<i>Listeria spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria innocua</i> ATCC33090	μ_{\max}	γ -concept, CM ₁ pour le pH, CM ₂ pour l' a_w , IS _n pour l'acide lactique + interactions	pH, a_w , acide lactique
Lebert <i>et al.</i> (2005)	<i>Listeria innocua</i>	$\sqrt{(\mu_{\max})}$	γ -concept, CM ₁ pour le pH, CM ₂ pour la température et l' a_w	Température, pH, a_w
Lebert <i>et al.</i> (2007b)	<i>Listeria innocua</i>	$1/\lambda, \mu_{\max}$	γ -concept, CM ₁ pour le pH, CM ₂ pour la température et l' a_w	Température, pH, a_w
Skandamis <i>et al.</i> (2007)	<i>Escherichia coli</i>	$\ln(\mu_{\max})$	Polynôme	Température, pH
Theys <i>et al.</i> (2008)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	$\sqrt{(\mu_{\max})}$	Ratkowsky étendu basé sur Ross <i>et al.</i> (2003)	pH, NaCl/ a_w , gel
Muñoz-Cuevas <i>et al.</i> (2010)	<i>Listeria monocytogenes</i>	$\sqrt{(\mu_{\max})}, \sqrt{(h_0)}$	Ratkowsky étendu	Température, a_w
Huang (2011)	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>	$1/\sqrt{(\lambda)}, \sqrt{(\mu_{\max})}$	Ratkowsky étendu	Température
Kapetanakou <i>et al.</i> (2011)	<i>Aspergillus carbonarius</i>	$\sqrt{(\mu_{\max})}$	Polynôme / Ratkowsky étendu	Température, a_w , gel
Schvartzman <i>et al.</i> (2011)	<i>Listeria monocytogenes</i>	μ_{\max}	γ -concept, CM ₂ pour la température, CM ₁ pour le pH, SR ₁ pour l' a_w et IS ₁ pour l'acide lactique	Température, pH, a_w , acide lactique
Zhang <i>et al.</i> (2011)	<i>Pseudomonas spp.</i>	$\sqrt{(1-\lambda)}, \sqrt{(\mu_{\max})}$	Ratkowsky	Température
Zhou <i>et al.</i> (2011)	<i>Salmonella enterica</i>	$\ln(h_0), \ln(\mu_{\max})$	Relation empirique d'ordre 2	a_w

I.3.4. DÉFIS DE LA MODÉLISATION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE DANS UN ALIMENT RÉEL

Tout modèle est une simplification de la réalité. En ce qui concerne la modélisation de la croissance microbienne, on se heurte rapidement à la complexité de la situation réelle dans une denrée alimentaire. Il alors est nécessaire de faire un certain nombre d'hypothèses simplificatrices qui induisent des erreurs dans les prédictions comme l'expliquent Ross *et al.* (2000) avec la notion de « completeness error » et comme le montre la Figure 10 issue de Pin *et al.* (1999). Cette complexité est discutée dans la section I.3.4.1 ci-après autour des différences entre la croissance dans un milieu liquide et sur un support solide.

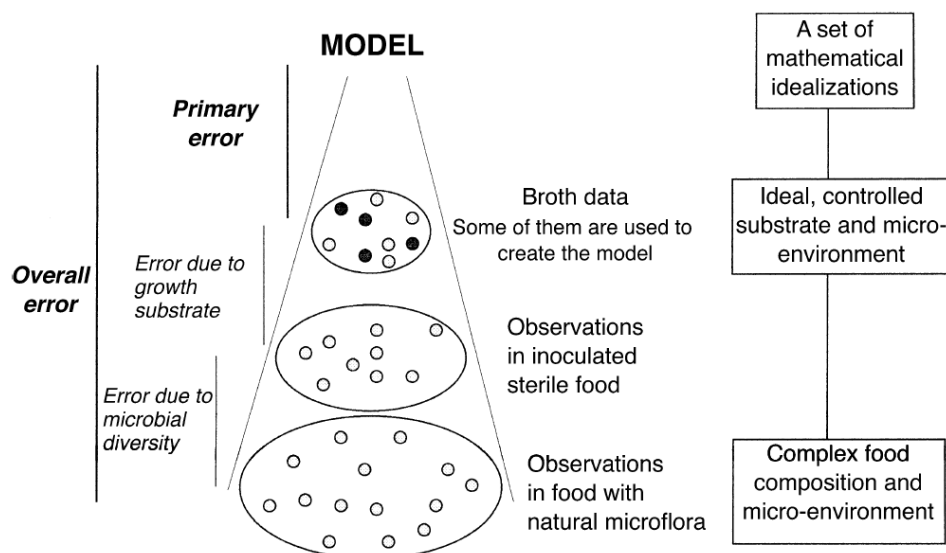


Figure 10. Différents niveaux d'erreur dans la modélisation de la croissance bactérienne. Source : Pin *et al.* (1999).

Le dernier niveau de complexité concernant la croissance microbienne est la prise en compte des interactions entre populations microbiennes. Cette question est adressée par un certain nombre d'auteurs (Aggelis *et al.*, 1998; Dens *et al.*, 1999; Vereecken *et al.*, 2000; Poschet *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2006; Antwi *et al.*, 2007; Papathomopoulou & Kotzekidou, 2009) et notamment Wimpenny *et al.* (1995) et Dens & Van Impe (2001) qui prennent en compte la notion spatiale dans les interactions entre populations microbiennes, mais ne sera pas abordée plus en détail ici.

I.3.4.1. CROISSANCE SUR UN SUPPORT SOLIDE

La formation de bio-films a toujours été un sujet d'intérêt dans l'industrie agro-alimentaire et les mécanismes d'adhésion bactérienne sont étudiés de manière fondamentale (Garrett *et al.*, 2008; Hori & Matsumoto, 2010) mais aussi sur les aliments dans des travaux tels que ceux de Hassan & Frank (2004) qui étudient l'adhésion de *Escherichia coli* sur la laitue et les pommes ou ceux de Piette & Idziak (1989), Benito *et al.* (1996) et Marín *et al.* (1997) qui étudient l'adhésion sur la surface de la viande. Des changements assez importants ont été observés du point de vue de l'expression des protéines (Vilain *et al.*, 2004), de la structure de la membrane cellulaire (Coquet *et al.*, 2005) et du métabolisme en général (Sampathkumar *et al.*, 2006) lors du passage de l'état planctonique à l'état immobilisé, et Vilain *et al.* (2004) ainsi que Sampathkumar *et al.* (2006) vont jusqu'à suggérer que l'état immobilisé représente un phénotype complètement différencié de l'état planctonique.

I.3.4.2. STRATÉGIES DE MODÉLISATION PRENANT EN COMPTE L'EFFET MATRICE

Des différences aussi prononcées impliquent, du point de vue de la modélisation de la croissance microbienne, que les prédictions réalisées en milieu liquide ne sont pas extrapolables dans le cas d'une croissance sur/dans un milieu solide et donc qu'il est nécessaire de mettre en œuvre des stratégies pour prendre en compte le facteur spatial. Parker *et al.* (1998) réalisent une étude en microscopie électronique pour mettre en évidence les différentes niches et les formes de colonisation par des micro-organismes selon la localisation dans un fromage. Koutsoumanis *et al.* (2004a) comparent les intervalles de croissance de *Listeria monocytogenes* en milieu tryptone soja et sur une gélose de même composition en fonction de la température, du pH et de l'activité en eau. Theys *et al.* (2008) et Kapetanakou *et al.* (2011) intègrent l'effet structure dans le modèle secondaire comme un facteur environnemental au même titre que le pH ou l'activité en eau. Lebert *et al.* (2007b) et Noriega *et al.* (2009) incorporent l'effet de la structure au travers d'un modèle global qui intègre des équations de diffusion d'eau par séchage de la surface dans le cas de Lebert *et al.* (2007b) et d'oxygène au travers du gel pour Noriega *et al.* (2009).

I.3.4.3. BONNES PRATIQUES DE MODÉLISATION

La microbiologie prévisionnelle est une discipline en plein essor comme le témoignent l'importante production scientifique sur le sujet ainsi que les initiatives de construction de bases de données unificatrices au travers d'interfaces-utilisateur (modèles tertiaires). Toutefois, le travail d'unification est loin d'être terminé car, comme le précise Marks (2008), les données utilisées pour construire les modèles ne sont jamais acquises dans les mêmes conditions, ni dans les mêmes milieux de culture, ni pour les mêmes souches, etc. et les résultats ne sont jamais traités de la même façon.

D'autre part, malgré l'important volume de connaissances déjà acquises il y a encore du terrain à couvrir pour que la discipline, encore trop axée sur l'étude des pathogènes, se dirige vers une étude plus approfondie des flores bénéfiques telles que les bactéries lactiques. Dans ce sens, les avancées en génomique et en protéomique bénéficieront grandement à la microbiologie prévisionnelle étant donné qu'ayant accès aux schémas et aux cinétiques réactionnels intracellulaires (Llaneras & Picó, 2008) les bactéries ne seront plus considérées comme des boîtes noires ce qui permettra d'aboutir à une amélioration de la qualité des prédictions, notamment en ce qui concerne la durée de la phase de latence.

Enfin, étant donné les nombreux modèles et approches à disposition il est important, pour faire une utilisation productive de la microbiologie prévisionnelle, de bien positionner le cadre dans lequel cet outil est utilisé (Pouillot & Lubran, 2011) afin de faire un choix raisonné en ce qui concerne les différents modèles ainsi que les hypothèses simplificatrices qui peuvent être émises (ou pas). Il existe des techniques pour comparer différents modèles entre eux (Baranyi *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2004), mais de manière générale, le choix d'un modèle rapport à un autre doit se baser sur le volume et la qualité des données expérimentales à disposition, tout en procédant selon les « bonnes pratiques de modélisation » (Whiting, 1995; Baranyi *et al.*, 1996) :

- modèle avec une bonne qualité d'ajustement,
- modèle construit pour des intervalles de facteurs environnementaux compatibles avec le domaine d'utilisation,
- modèle capable de prédire correctement la résultante de combinaisons de facteurs hormis celles utilisées pour la construction du modèle,
- modèle qui tienne compte, dans la mesure du possible, de tous les facteurs importants (ou pouvoir justifier de les négliger),
- modèle ayant le moins de paramètres possible (principe de parcimonie),
- modèle avec des paramètres ayant une signification biologique.

I.4. POSITIONNEMENT DE LA THÈSE

Il ressort de cette bibliographie que peu de produits carnés non-divisés sont reconnus comme fermentés. En effet, il est plus communément admis que seuls les produits divisés sont fermentés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la fermentation des produits non-divisés se ferait de façon spontanée du fait du développement d'une flore endogène. Quoi qu'il en soit, la théorie des barrières étaye bien l'idée qu'une étape de fermentation contrôlée peut permettre d'améliorer la qualité microbiologique et sensorielle tout en aboutissant à des produits finis moins transformés. Dans les pays du Sud ou en conditions tropicales, où l'altération de la viande est accrue et où la matière première est de qualité microbiologique irrégulière, un couplage DII-fermentation est proposé pour traiter de morceaux de viande de petite taille afin de sélectionner par le procédé une flore bénéfique, *L. sakei*. Son adaptation évolutive au milieu viande et aux conditions régnant dans la fabrication des produits carnés de salaison stables à température ambiante, lui permet d'être compétitive par rapport aux autres microorganismes pathogènes ou d'altération. Cependant, l'impact des facteurs environnementaux sur la croissance de *L. sakei* est plus complexe dans le cas d'une croissance en surface que dans un produit divisé notamment parce que la formulation (en sel et en sucres) implique des gradients entre la surface et le cœur du morceau qui pourraient influencer les mécanismes fermentaires se déroulant à la surface. Pour permettre un couplage efficace d'une étape de DII et d'une fermentation lactique de surface, il faut étudier la capacité de *L. sakei* à fermenter une viande pré-traitée par DII. Une première étude de faisabilité sur aliment réel validera ce couplage et la suite du travail aura pour objectif de proposer un modèle qui apportera des éléments de réponse en vue d'optimiser l'ensemble du procédé. Pour ce faire, un modèle de croissance de *L. sakei* en fonction des facteurs environnementaux d'intérêt sera construit puis inséré dans un modèle global qui décrit l'évolution de la surface sur laquelle est inoculée *L. sakei*.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. DÉROULEMENT DES ESSAIS

II.1.1. ÉTUDE SUR ALIMENT RÉEL

II.1.1.1. PRÉPARATION DES FILETS DE VIANDE

Du rond-de-gîte de bœuf (muscle *semitendinosus*) provenant d'une boucherie locale a été utilisé pour les essais. L'origine des muscles, leur âge, la durée et les conditions de transport et de conservation chez le boucher sont des sources d'hétérogénéité de la matière première. Ainsi, pour minimiser l'erreur expérimentale due à cette hétérogénéité, les filets pour un essai donné sont prélevés, dans la mesure du possible, sur un même muscle (Santchurn, 2009).

Le muscle est raffermi par un séjour de quelques minutes dans un surgélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour faciliter la découpe, puis tranché parallèlement aux fibres musculaires à l'aide d'un trancheur à jambon, et découpé en parallélépipèdes rectangulaires de dimension $7 \times 5 \times 1\text{ cm}$ (masse initiale d'un filet environ 40 g). Ces dimensions ont été choisies à la fois pour obtenir un maximum de filets d'un même muscle pour réduire la variabilité intra-échantillon mais aussi pour avoir des traitements de DII efficaces (Rastogi *et al.*, 2002). Une fois découpés, les filets de viande sont conditionnés dans des sacs individuels et conservés à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avant la DII, les filets sont décongelés à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant la nuit (18 h), essuyés avec du papier filtre pour éliminer l'eau en surface, pesés et ramenés à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

II.1.1.2. TRAITEMENT DES FILETS DE VIANDE PAR DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION

Les bains de DII sont élaborés en dissolvant du NaCl et du sirop de glucose dextrose équivalent 21 (DE 21; Glucidex® IT21, Roquette, Lestrem, France) dans de l'eau distillée stérile. Le DE 21 est un sirop d'amidon de maïs qui contient 1,4 % (p/p) de glucose (G1), 6,0 % de maltose (G2), 8,2 % de maltotriose (G3) et 7,5 % de maltotetraose (G4). Les polysaccharides avec un degré de

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

polymérisation supérieur à 10 unités représentent 47,2 % (p/p). Une composition détaillée du DE 21 est donnée par Santchurn *et al.* (2007). Les caractéristiques des trois traitements, DII-20, DII-30 et DII-40, sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Conditions et transferts de matière souhaités au cours des traitements de Déshydratation-Imprégnation par Immersion DII-20, DII-30, DII-40.

Traitement de DII		DII-20	DII-30	DII-40
Conditions de traitement	Temps (h)	5	18	30
	Température (°C)	25	25	25
	DE 21 (g/kg d'eau)	950	950	950
	NaCl (g/kg d'eau)	100	75	87,5
Transferts de matière souhaités	Perte en eau (% masse initiale)	20	30	40
	Gain en sel (% masse initiale)	2,2	2,2	2,2

La DII est conduite à 25 °C dans des récipients en polypropylène de 2,5 l (ratio massique produit/solution 1/15), fermés hermétiquement et placés sur une table d'agitation (modèle Laboshake 20, Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Allemagne) à 80 rpm. Les filets de viande sont placés entre des grilles horizontales maintenues en position par un système de tiges en acier inoxydable (Figure 11).

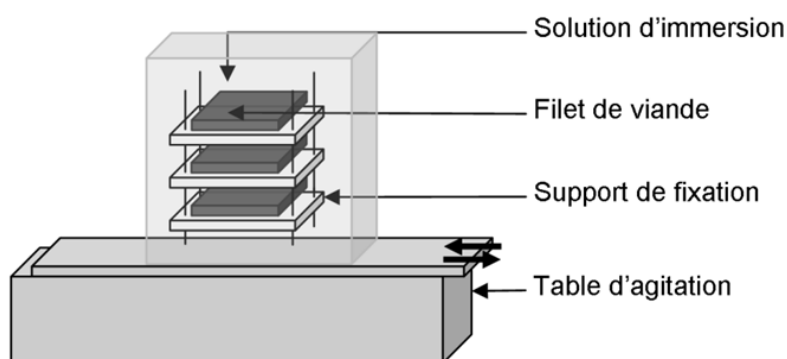


Figure 11. Représentation schématique du dispositif mis en œuvre pour traiter les filets de viande par Déshydratation-Imprégnation par Immersion.

En fin de DII, les filets sont retirés de la solution d'immersion, rincés dans de l'eau stérile, séchés avec un papier absorbant, pesés et reconditionnés dans des sacs individuels et conservés à 4 °C pendant 18 h afin de rééquilibrer les concentrations en eau, sel et sucres au sein du filet.

II.1.1.3. SOUCHE DE *LACTOBACILLUS SAKEI*

La souche de *L. sakei* Tradi 313 (Soussana, Thiais, France) sous forme lyophilisée est utilisée dans les essais sur aliment réel.

II.1.1.4. PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D'INOCULATION

La suspension d'inoculation est préparée à 10^9 UFC/ml dans de l'eau stérile à 9 g/l de NaCl, 100 g/l de la souche *L. sakei* Tradi 313 et 5 g/l de Delvolid® (DSM, Heerlen, Pays-Bas) pour éviter le développement des levures et moisissures.

II.1.1.5. INOCULATION ET INCUBATION DES FILETS DE VIANDE

Après l'équilibrage, les filets sont inoculés par trempage pendant 5 s dans la suspension d'inoculation. Dans le but de vérifier l'impact de l'inoculation avec *L. sakei*, un groupe témoin a été constitué de filets non-inoculés. Enfin, tous les filets, inoculés et témoins, sont arrangés sur un support en acier inoxydable en utilisant des crochets et placés dans une enceinte climatique (modèle CL, BIA, Conflans Sainte Honorine, France) à 25 °C, 98 % HR pendant 24 h.

II.1.1.6. ÉCHANTILLONNAGE

Des échantillons sont prélevés avant et après DII, après inoculation (0 h), après 12 h et 24 h d'incubation et pour le groupe témoin après 24 h d'incubation seulement. Pour chaque temps d'échantillonnage trois filets sont analysés.

Pour les dénombrements microbiologiques, un cube de $1 \times 1 \times 1$ cm (3 g) est prélevé en conditions stériles au centre du filet (Figure 12). Ce cube permet d'échantillonner les deux surfaces du filet et est suffisant en taille pour être représentatif de l'ensemble du filet. Il est placé avec 27 ml d'eau peptonée tamponnée 10 % (p/v) dans un broyeur Stomacher (ATL, Laboratoires Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, France) pendant 8 min à 240 rpm pour constituer la suspension-mère utilisée dans les dénombrements. Le reste du filet est broyé dans un broyeur domestique pour les analyses physico-chimiques.

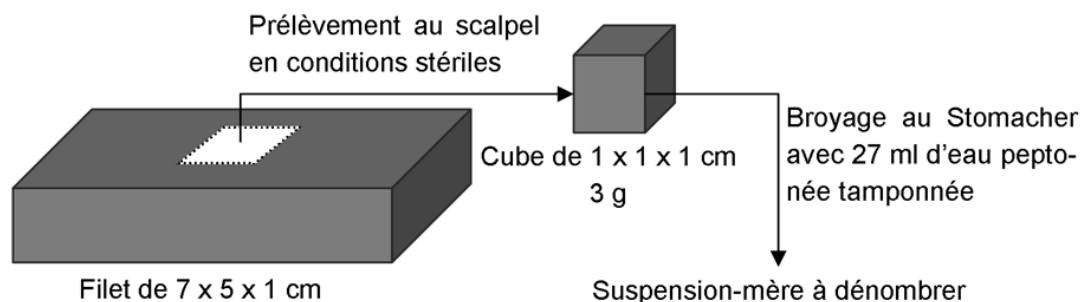


Figure 12. Méthode d'échantillonnage des filets de viande utilisée pour les dénombrements microbiologiques.

II.1.2. ÉTUDE EN MILIEU MODÈLE

II.1.2.1. FONCTIONNEMENT DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Le dispositif utilisé dans ce travail est présenté dans la Figure 1 §2.2. « *Experimental device description* » du matériel et méthodes de l'article 2 (Section III.2) et de manière plus détaillée dans la Figure 13 ci-dessous. Il est composé d'un corps en verre (volume ≈ 100 ml), rempli avec un milieu de culture liquide, et d'une ouverture comportant une membrane en polyethersulfone (PES) de 47 mm de diamètre et d'une porosité de $0,45 \mu\text{m}$ (Merck Millipore, Billerica, MA, États-Unis).

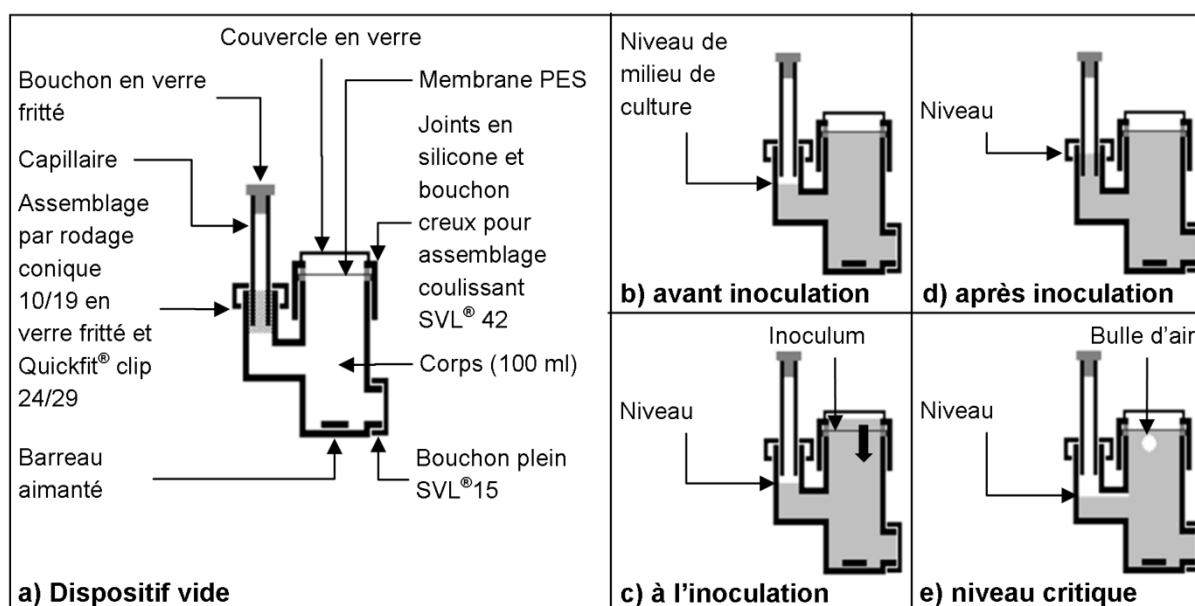


Figure 13. Dispositif expérimental, représentation schématisée du dispositif vide (a), dispositif rempli avec un milieu de culture liquide avant l'inoculation (b), à l'inoculation (c), juste après l'inoculation (d) et niveau critique du milieu de culture (e).

Le dispositif est rempli en ajoutant du milieu de culture jusqu'à ras-bord de l'ouverture supérieure, puis le bouchon SVL® 42 avec la membrane déjà en place est vissé. Le remplissage se termine par le capillaire en penchant le dispositif pour chasser les bulles d'air qui s'infiltrèrent sous la membrane et le niveau de milieu est ajusté en dessous du niveau de la membrane (Figure 13b). Lorsque la suspension d'inoculation contenant *L. sakei* est placée sur la face supérieure de la membrane (Figure 13c), le liquide de la solution s'infiltré à travers la membrane d'une part par capillarité et d'autre part grâce à la différence de niveau entre le corps du dispositif et le capillaire, et les bactéries restent en surface. Par la suite, lorsque le dispositif est en fonctionnement (Figure 13d), la surface supérieure de la membrane supporte la croissance de *L. sakei* pendant que la surface inférieure est en contact permanent avec le milieu de culture agité. Ceci permet aux bactéries d'accéder aux nutriments de manière continue et non-limitante et de la même manière d'évacuer les produits du métabolisme fermentaire tels que l'acide lactique. Lorsque, du fait de l'évaporation du milieu de culture à travers la membrane, le niveau dans le capillaire passe en deçà d'un niveau critique (Figure 13e), des bulles d'air se forment sous la membrane et les bactéries ne sont plus en contact permanent avec le milieu de culture. Toutefois, la présence du couvercle en verre au dessus de la membrane limite cette évaporation et le niveau critique n'est jamais atteint au cours des essais.

II.1.2.2. MILIEU DE CULTURE LIQUIDE CONTENU DANS LE DISPOSITIF

Le milieu dénommé MYG pour « Meat, Yeast, Glucose » se compose de 10 g/l d'extrait de viande (BBL™ Beef Extract Powder, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, États-Unis), 5 g/l d'extrait de levure (Bacto™ Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, États-Unis) et 5 g/l de glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Après stérilisation par autoclave (15 min à 121 °C) le pH du milieu est ajusté en conditions stériles avec de l'acide chlorhydrique (HCl 1N) à un pH de 5,60.

II.1.2.3. FORMULATION DU MILIEU DE CULTURE CONTENU DANS LE DISPOSITIF

Le milieu MYG est formulé en activité en eau, en utilisant du glycérol pur (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, États-Unis) et en NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). La variation de l'activité en eau du milieu en fonction de l'ajout de ces deux composants est présentée dans la Figure 14.

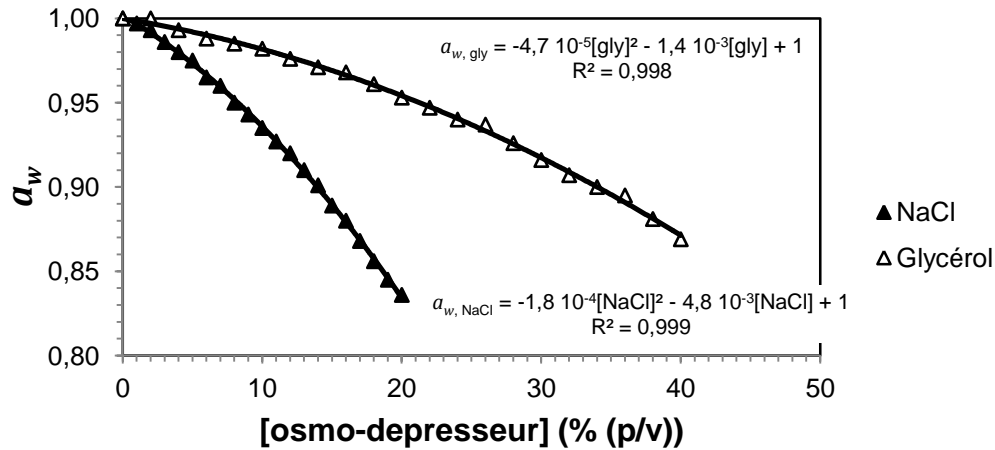


Figure 14. Activité en eau du milieu MYG en fonction de la concentration en NaCl ([NaCl] (▲)) et en glycérol ([gly] (△)).

D'autre part, afin de déterminer la concentration en acide lactique non-dissocié en fonction du pH, un MYG contenant 2 % (p/v) d'acide lactique (pureté 80 % (p/v), Grosseron, Saint-Herblain, France) a été neutralisé progressivement avec de la soude (NaOH 5N) jusqu'à atteindre un pH de 5,60. La concentration en LaH a été calculée selon le système d'équations (26) pour chaque valeur de pH pour obtenir la courbe de la Figure 15.

$$\begin{cases} \frac{La^-}{LaH} = 10^{pH - pK_a} \\ La^- + LaH = ac. \text{ lactique total (mol)} \end{cases} \quad (26)$$

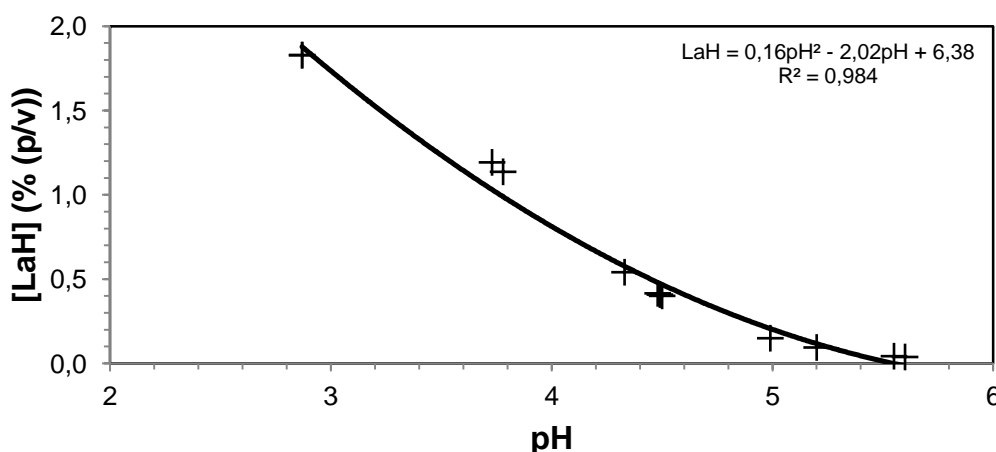


Figure 15. Concentration en acide lactique non-dissocié ([LaH]) en fonction du pH du milieu MYG contenant 2 % (p/v) d'acide lactique neutralisé jusqu'à pH 5,60 par ajout progressif de soude (NaOH 5N).

Les effets du pH et de LaH sur la croissance deviennent importants à des valeurs proches des valeurs en fin de fermentation d'un produit type saucisson sec c'est-à-dire un pH voisin de 4,7 et une teneur en acide lactique total proche de 2 % (p/p). D'autre part, il est d'autant plus pertinent d'étudier l'effet de LaH à pH 4,70 plutôt qu'à 5,60, valeur trop éloignée du pKa de l'acide lactique à laquelle la forme non-dissociée n'est quasiment pas présente (Figure 15). À l'aide de l'équation du polynôme de régression en Figure 15 ($\text{LaH} = 0,16\text{pH}^2 - 2,02\text{pH} + 6,38$), on déduit qu'à pH 4,70, 2 % (p/v) d'acide lactique total correspondent à 0,4 % (p/v) de LaH soit un pourcentage d'environ 18 %. Par la suite, pour formuler le MYG en LaH à pH 4,70, cette valeur sera utilisée pour déterminer la quantité d'acide lactique total qu'il faut ajouter pour avoir une concentration en LaH donnée.

II.1.2.4. SOUCHE DE *LACTOBACILLUS SAKEI*

La souche de *L. sakei* DGCC5038 utilisée dans les essais en dispositif a été fournie par Danisco (Danisco, Copenhagen, Danemark) sous forme lyophilisée.

II.1.2.5. PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D'INOCULATION

Une pré-culture de *L. sakei* est préparée en plaçant 0,1 g/l de la souche lyophilisée dans 250 ml de MYG et incubés à 25 °C pendant 3 h (début de phase exponentielle de croissance). La pré-culture est ensuite diluée d'un facteur d'environ 100 selon une mesure d'absorbance à 600 nm pour obtenir une suspension d'inoculation à 5,0 log₁₀ UFC/ml.

II.1.2.6. INOCULATION ET INCUBATION DES DISPOSITIFS

Les dispositifs préalablement stérilisés par autoclave (15 min à 121 °C) puis remplis avec le milieu de culture MYG en conditions stériles, sont inoculés en plaçant 1 ml de la suspension d'inoculation sur la membrane. La charge atteinte sur la membrane est ainsi autour de 4 log₁₀ UFC/cm². Les dispositifs sont placés sur un agitateur magnétique multipostes (VELP Scientifica, Usmate, Italie) dans une enceinte climatique (modèle CL, BIA, Conflans-Sainte-Honorine, France) à 25 °C pour incubation.

II.1.2.7. ÉCHANTILLONNAGE

Pour chaque temps d'échantillonnage, un dispositif est sorti de l'enceinte climatique. La membrane et le milieu de culture MYG sont prélevés en conditions stériles. Le milieu de culture peut-être analysé directement (mesure du pH) ou stocké à -20 °C pour être analysé ultérieurement (dosage du D-glucose, et des acides D- et L-lactique). La membrane est placée dans un tube à centrifuger de 50 ml avec des billes en verre stériles et 10 ml d'eau peptonée tamponnée à 2 % (p/v). Après passage au vortex pendant une minute pour décrocher les cellules de la membrane, on obtient la suspension-mère qui sera utilisée pour les dénombrements.

II.2. MÉTHODES ANALYTIQUES

II.2.1. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

II.2.1.1. MESURE DE L'ACTIVITÉ EN EAU

L'activité en eau est mesurée à l'aide d'un Awmètre (modèle FA-st/1, GBX, Romans, France) à 25 °C avec une précision de $\pm 0,003$ unités. L'appareil est préalablement calibré avec des solutions de NaCl à 0,6M ($a_w = 0,980$) et à saturation ($a_w = 0,753$). Chaque mesure est triplée et l'activité en eau correspond à la moyenne arithmétique des trois répétitions.

II.2.1.2. MESURE DE LA TENEUR EN EAU

La teneur en eau est déterminée par gravimétrie avec une méthode adaptée de la norme NF V04-401 (AFNOR, 1968). L'échantillon est séché à 103 °C et à pression atmosphérique dans un four (OSI-Thermosi SR 3000) jusqu'à poids constant (24 h). La prise d'essai est de 10 g de broyat de viande.

II.2.1.3. MESURE DE LA TENEUR EN SEL

La teneur en sel est déterminée à l'aide d'un chloruremètre (Corning modèle 926, Sherwood Scientific, Cambridge, Grande Bretagne) à partir de broyats de viande après extraction à froid pendant 2 h sous agitation dans de l'acide nitrique (HNO_3 0,3N) (Bohuon, 1995). La prise d'essai est de 3 g de broyat pour le dosage sur la viande fraîche ou 0,3 g pour le dosage sur les viandes ayant subi une DII.

II.2.1.4. MESURE DU PH

Le pH a été mesuré avec un titrateur automatique (TitroLine® easy titrator, SI Analytics GmbH, Mainz, Allemagne) avec une précision de $\pm 0,05$ unités.

II.2.1.5. DOSAGE DU D-GLUCOSE ET DES ACIDES D- ET L-LACTIQUE

Le dosage du D-glucose et des acides D- et L-lactique est réalisé à l'aide des kits enzymatiques Enzytec™ *fluid* Id-N°5140 pour le D-glucose, Id-N°5240 pour l'acide D-lactique et Id-N°5260 pour l'acide L-lactique (SCIL Diagnostics GmbH, Viernheim, Allemagne). Les limites de détection sont respectivement 0,020 g/l, 0,025 g/l, et 0,025 g/l pour le D-glucose, et les acides D- et L-lactique.

Les échantillons issus des essais sur aliment réel (broyats de viande) nécessitent un traitement préalable de clarification des protéines avant d'être analysés avec les kits enzymatiques. Une prise d'essai de 2,5 g de broyat est placée dans une fiole jaugée de 50 ml dans laquelle sont ajoutés successivement et en agitant entre chaque ajout : 30 ml d'eau distillée, 2,5 ml de chacune des solutions de Carrez (solution I : 3,6 % (p/v) $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et solution II : 7,2 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et 5 ml de soude (NaOH 0,1N), pour enfin compléter avec de l'eau distillée. La suspension ainsi obtenue est filtrée sur filtre plissé avant dosage.

II.2.2. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

II.2.2.1. DÉNOMBREMENTS

À partir des échantillons préparés selon la section II.1.1.6 pour les essais sur aliment réel, ou selon la section II.1.2.7 pour les essais en milieu modèle, des dilutions décimales sont réalisées en vue des dénombrements.

La flore aérobie mésophile totale est dénombrée sur milieu PCA (Plate Count Agar) (Oxoid, Cambrigde, Grande Bretagne) par ensemencement dans la masse (1 ml) après 24 h d'incubation à 30 °C. Les levures et moisissures sont dénombrées sur milieu Sabouraud + Chloramphénicol (SAB) (Oxoid, Cambrigde, Grande Bretagne) par ensemencement en surface (0,1 ml) après 48 h d'incubation à 30 °C. La flore lactique est dénombrée sur milieu de Man Rogosa & Sharpe (MRS) (Oxoid, Cambrigde, Grande Bretagne), en surface pour les essais sur aliment réel et dans la masse pour les essais en dispositif expérimental, après 48 h d'incubation à 30 °C. Pour chaque

prélèvement, trois dilutions successives sont dénombrées sur deux ou trois boîtes de milieu de culture.

II.2.2.2. PCR QUANTITATIVE

La PCR quantitative (qPCR) a été utilisée pour quantifier de manière spécifique les populations de *L. sakei* dans le cadre des essais sur aliment réel. Pour ce faire, des extractions d'ADN ont été effectuées selon le protocole de Leasing (2005) sur des cultures pures de *L. sakei* Tradi 313 en milieu MRS ainsi que sur des échantillons de viande.

La qPCR a été conduite sur ces extraits d'ADN dans un appareil de type Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, États-Unis) en utilisant le Brilliant SYBR® Green Side Step qPCR Master Mix (Agilent Technologies) sur un volume de réaction de 25 µl contenant les amorces « sens » et « anti-sens ». Les séquences de ces amorces (sakF 5'GATAAGCGTGAGGTCGATGGTT3', et sakR 5'GAGCTAATCCCCATAATGAACTAT3') ont été conçues pour amplifier un fragment de 78 paires de bases de la région intergénique de l'ARNr 16S-23S de *L. sakei* (ITS pour « Intergenic Transcribed Spacer » en anglais) et ont permis la détection de 52 souches différentes de *L. sakei* isolées de divers produits carnés fermentés (Martín *et al.*, 2006).

II.3. TRAITEMENT DES DONNÉES

II.3.1. TRAITEMENT STATISTIQUE

L'analyse statistique des données a été effectuée avec le logiciel Statistica (version 7.0, StatSoft, Tulsa, OK, États-Unis). Dans l'analyse de variance (ANOVA), la méthode de la plus petite différence significative de Fisher est utilisée pour constituer des groupes homogènes avec un niveau de significativité de 95 % (et donc un risque de première espèce $\alpha = 0,05$).

II.3.2. TRANSFERTS DE MATIÈRE AU COURS DE LA DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION

Les transferts de matière au cours de l'étape de DII sont caractérisés par la perte en poids (PP), la perte en eau (PE), le gain en sel (GS) et le gain en D-glucose (GGlu) et en sucres totaux (GSu) (Équations (27) à (31)). Ces indicateurs sont exprimés en grammes pour 100 g de masse initiale de viande. Le choix de les exprimer en fonction de la masse initiale s'explique par le fait que la masse du produit varie au cours du traitement de DII du fait de la perte en eau et l'imprégnation en solutés.

$$PP = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (27)$$

$$PE = TE_i - \frac{m_f}{m_i} TE_f \quad (28)$$

$$GS = \frac{m_f}{m_i} TS_f - TS_i \quad (29)$$

$$GGlu = \frac{m_f}{m_i} TGlu_f - TGlu_i \quad (30)$$

$$GSu = PE - GS - PP \quad (31)$$

Ici m [g] est la masse de produit, TE [g/100 g (b.h.)] est la teneur en eau, TS [g/100 g (b.h.)] est la teneur en sel, et $TGlu$ [g/100 g (b.h.)] est la teneur en D-glucose. L'indice i est l'indice relatif à l'instant $t = 0$, le début de l'immersion et f est l'indice relatif à la fin de l'immersion.

II.3.3. MODÈLE DE DIFFUSION D'EAU ET DE SEL AU SEIN DE LA VIANDE

Afin de décrire l'évolution des fractions massiques d'eau et de sel dans la viande pendant la DII et la période d'équilibrage, les hypothèses suivantes sont utilisées :

- (H1) Les dimensions des filets sont choisies de sorte à ce qu'ils puissent être considérés comme des plaques semi-infinies d'épaisseur $L = 1 \times 10^{-2}$ m petite par rapport à la largeur et la longueur.
- (H2) La matrice viande est homogène, ne se rétracte pas, et aucune réaction chimique n'y a lieu.
- (H3) En raison de l'importante masse moléculaire de la plupart des dextrines du sirop de glucose DE 21, celles-ci sont supposées ne pas pénétrer dans la viande au cours de la DII.
- (H4) En raison de la bonne agitation des solutions d'immersion, la concentration en NaCl du liquide adjacent à la surface de la viande est considérée comme étant égale à la concentration en NaCl de la viande à l'interface (aucun effet de couche limite). L'activité en eau à la surface de la viande est supposée égale à celle de la solution d'immersion.
- (H5) Les transports d'eau et de NaCl sont décrits par un modèle de diffusion pseudo-binaire et caractérisé par les coefficients de diffusion effectifs d'eau et de sel, D_i^{eff} et $D_{\text{NaCl}}^{\text{eff}}$ respectivement, indépendants des fractions massiques d'eau et de sel (w_i and w_{NaCl}).

Les équations différentielles aux dérivées partielles (PDE pour « Partial Differential Equation » en anglais) utilisées sont celles de la géométrie plaque :

$$\frac{\partial w_i}{\partial t} = D_i^{\text{eff}} \frac{\partial^2 w_i}{\partial z^2} \quad (i = \text{eau ; NaCl}) \quad (32)$$

avec les conditions suivantes :

$$t = 0 \quad \forall z \quad w_i = w_i^0 \quad \text{avec } w_{\text{eau}}^0 = 0,75 \text{ et } w_{\text{NaCl}}^0 = 0 \quad (33)$$

$$t_{\text{DII}} \geq t > 0 \quad z = 0 \quad \frac{\partial w_i}{\partial z} = 0 \quad (34a)$$

$$z = L/2 \quad w_i = w_i^\infty \quad (34b)$$

$$t > t_{\text{DII}} \quad z = 0 \quad \frac{\partial w_i}{\partial z} = 0 \quad (35a)$$

$$z = L/2 \quad \frac{\partial w_i}{\partial z} = 0 \quad (35b)$$

Ici w_i correspond au cœur des filets et w_i^∞ à la surface, t_{DII} sont les conditions aux limites pour les fractions massique d'eau ou de NaCl, t_{DII} est le temps d'immersion des traitements de DII suivi par la période d'équilibration (t_{DII}) au cours de laquelle le flux massique est nul à l'interface.

L'activité en eau des solutions d'immersion ternaires eau-sel-sirop de glucose est déterminée en utilisant le modèle de Deumier & Bohuon (2005):

$$a_w = 1 - 3,14 \cdot 10^{-2} m_{\text{NaCl}} - 1,08 \cdot 10^{-2} m_{\text{DE21}} - 1,43 \cdot 10^{-3} m_{\text{NaCl}}^2 - 1,10 \cdot 10^{-2} m_{\text{DE21}}^2 + 2,65 \cdot 10^{-3} m_{\text{NaCl}} m_{\text{DE21}} \quad (36)$$

Ici m_{NaCl} et m_{DE21} sont les molalités (mol/kg d'eau) du NaCl et du sirop de glucose DE 21. Pour calculer la molalité du sirop de glucose DE 21, la masse molaire médiane de 1007 g/mol donnée par Deumier & Bohuon (2005) a été utilisée.

Le modèle de Van der Sman & Boer (2005) est utilisé dans la prédiction de l'activité en eau de la viande :

$$a_w = \frac{(w_{\text{eau}} - w_{\text{eau liée}})}{[(w_{\text{eau}} - w_{\text{eau liée}}) + \frac{18,02}{58,44} w_{\text{NaCl}} \times 1]} \quad (37)$$

$$w_{\text{eau liée}} = 0,3w_{\text{protéines}} + 0,1w_{\text{sucres}} \quad (37b)$$

Ici w_{eau} [-] est la fraction massique d'eau, $w_{\text{eau liée}}$ [-] est la fraction massique d'eau liée, w_{NaCl} [-] est la fraction massique de NaCl, $w_{\text{protéines}}$ [-] and w_{sucres} [-] sont les fractions massiques de protéines et de sucres respectivement avec $w_{\text{protéines}} = 0,25$ et w_{sucres} considéré comme étant nul en accord avec l'hypothèse (H3).

II.3.4. MODÈLES DE CROISSANCE BACTÉRIENNE

II.3.4.1. MODÈLE PRIMAIRE

Dans cette étude, le modèle primaire de Huang (2008) (Section I.3.2.5) est utilisé pour exprimer l'évolution du nombre de cellules par centimètre carré de membrane (N) [UFC/cm²] au cours du temps (t) [h]. La forme intégrée exprimant $y(t)$, le logarithme népérien de N , est présentée dans les équations (38) et (39) :

$$y(t) = y_0 + y_{\max} - \ln\{\exp(y_0) + [\exp(-\mu_{\max} B(t))][\exp(y_{\max}) - \exp(y_0)]\} \quad (38)$$

$$B(t) = t + \frac{1}{\alpha} \ln \left\{ \frac{1 + \exp[-\alpha(t - \lambda)]}{1 + \exp(\alpha\lambda)} \right\} \quad (39)$$

Ici, y_0 [-] est le logarithme népérien de la population initiale (y_0), y_{\max} [-] est le logarithme népérien de la population maximale, α [-] est un paramètre de courbure, λ [h] est la durée de la phase de latence et μ_{\max} [h⁻¹] est la vitesse spécifique de croissance maximale.

À partir des données expérimentales acquises en milieu modèle, les paramètres du modèle primaire ont été ajustés de manière itérative en minimisant la somme des carrés des écarts (MSE pour « Mean Square Error » en anglais, Équation (40)) entre des valeurs mesurées (y) et prédites (\hat{y}) grâce à la méthode du simplex de Nelder-Mead (Lagarias *et al.*, 1998) à l'aide de la fonction « *fminsearch* » du logiciel Matlab® (version 6.5, The MathWorks Inc., Natick, MA, États-Unis).

$$MSE = \frac{1}{n_t - n_p} \sum_{i=1}^{n_t} (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (40)$$

Ici n_t est le nombre de points expérimentaux et n_p est le nombre de paramètres.

Dans le cadre de l'étude en milieu modèle, une procédure préliminaire d'estimation a été mise en œuvre en utilisant uniquement les données de l'essai de référence (Section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) dans le but de déterminer les valeurs de α and y_0 . Ces valeurs ont ensuite été considérées comme des constantes ($\alpha = 61$ et $y_0 = 9,55$ soit $N_0 = 4,2 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$) pour les autres essais en milieu modèle réduisant ainsi le nombre de paramètres à estimer à seulement trois : λ , μ_{\max} et y_{\max} . Après la procédure d'estimation des paramètres qui utilisait $y = \ln N$, les résultats sont commentés en N ou $\log_{10} N$.

La racine carrée de la somme des carrés des écarts (RMSE pour « Root Mean Squared Error » en anglais) entre les données expérimentales et les données prédites par le modèle a été utilisée comme indicateur de la qualité de l'ajustement du modèle. L'intervalle de confiance pour chacun des paramètres a été estimé via la méthode de Monte-Carlo avec 5000 simulations pour chaque essai en considérant l'incertitude expérimentale de la méthode de dénombrement sur boîte comme étant égale à 0,1 (Mossel *et al.*, 1995). La corrélation entre les paramètres estimés (λ , μ_{\max} et y_{\max}) a été évaluée en utilisant la fonction « *corrcoef* » du logiciel Matlab® (version 6.5, The MathWorks Inc.).

II.3.4.2. INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Le γ -concept (Section I.3.3.2) est utilisé pour décrire la dépendance de μ_{\max} à l'environnement pour des conditions données :

$$\mu_{\max} = \mu_{\max \text{ref}} \gamma_{\mu_{\max}}(a_w) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{NaCl}) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH}) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{LaH}) \quad (41)$$

Où $\mu_{\max, \text{ref}}$ est considéré comme la vitesse spécifique de croissance maximale optimale dans le cadre du plan d'expériences de l'étude en milieu modèle et $\gamma_{\mu_{\max}}(a_w)$, $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{NaCl})$, $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH})$ et $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{LaH})$ sont les fonctions- γ pour l'activité en eau, le pH et les effets spécifiques du NaCl et de l'acide lactique non-dissocié.

Chaque essai du plan d'expériences a donné une valeur de $\gamma_{\mu_{\max}} = \mu_{\max \text{essai}} / \mu_{\max \text{ref}}$ avec les autres fonctions- γ égales à 1. De ce fait, dans l'équation (41) $\gamma_{\mu_{\max}}(a_w)$ et $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH})$ sont donnés par les

essais $a_{w\text{ gly}}$ et pH_{HCl} respectivement. Dans l'équation (42) $\gamma_{\mu\text{max}}([\text{NaCl}])$ est donné par les essais NaCl et dans l'équation (43) $\gamma_{\mu\text{max}}([\text{LaH}])$ est donné par les essais LaH.

$$\gamma_{\mu\text{max}}([\text{NaCl}]) = \gamma_{\mu\text{max}}(a_w) \gamma_{\mu\text{max}}(\text{NaCl}) \quad (42)$$

$$\gamma_{\mu\text{max}}([\text{LaH}]) = \gamma_{\mu\text{max}}(\text{pH}) \gamma_{\mu\text{max}}(\text{LaH}) \quad (43)$$

L'effet spécifique du NaCl ($\gamma_{\mu\text{max}}(\text{NaCl})$) dans l'équation (41) est déduit selon l'équation (42) à partir de l'effet global du NaCl ($\gamma_{\mu\text{max}}([\text{NaCl}])$) et l'effet osmo-dépresseur ($\gamma_{\mu\text{max}}(a_w)$). De la même manière, l'effet spécifique de la forme non-dissociée de l'acide lactique ($\gamma_{\mu\text{max}}(\text{LaH})$) est déduit selon l'équation (43) à partir de l'effet global de l'acide lactique ($\gamma_{\mu\text{max}}([\text{LaH}])$) et l'effet pH-dépresseur ($\gamma_{\mu\text{max}}(\text{pH})$).

Pour chaque facteur environnemental (X), avec X l'activité en eau (a_w), la concentration en NaCl ($[\text{NaCl}]$), le pH ou la concentration en acide lactique non-dissocié ($[\text{LaH}]$), la fonction $\gamma_{\mu\text{max}}$ est donnée par la meilleure fonction du second degré qui vérifiait $\gamma = 0$ lorsque X prenait la valeur limite de croissance, et $\gamma = 1$ lorsque X prenait la valeur de référence ($a_w = 1,00$, $\text{pH} = 5,60$, $[\text{NaCl}] = 0$ ou $[\text{LaH}] = 0$).

Le γ -concept a été étendu pour décrire la dépendance de λ à l'environnement (Lebert *et al.*, 2007b).

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{1}{\lambda_{\text{ref}}} \gamma_{\lambda}(a_w) \gamma_{\lambda}(\text{NaCl}) \gamma_{\lambda}(\text{pH}) \gamma_{\lambda}(\text{LaH}) \quad (44)$$

II.3.5. MODÈLE INTÉGRANT LES TRANSFERTS DE MATIÈRE AU COURS ET APRÈS DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION ET LA CROISSANCE EN SURFACE DE *LACTOBACILLUS SAKEI*

Pour le modèle global qui décrit la croissance de *L. sakei* sur une viande pré-traitée par DII, le système est composé de trois variables : les fractions massiques d'eau et de sel à différentes positions dans les filets de viande décrites par le modèle détaillé dans la section II.3.3, et la population de *L. sakei* à la surface de la viande décrite par le modèle détaillé dans la

section II.3.4. Les deux équations différentielles (Équation (32)) sont résolues en utilisant le code basé sur la méthode des éléments finis (FEM pour « Finite Element Method » en anglais) du logiciel Comsol Multiphysics® (version 3.5, Comsol Inc., Stockholm, Suède) avec les conditions aux limites détaillées dans les équations (33) à (35). Le maillage de la plaque représentant le filet de viande est créé par Comsol Multiphysics® (30 éléments). La convergence des résultats était vérifiée. Les polynômes de Lagrange (fonctions du second ordre) sont utilisés comme fonctions d'interpolation. Le problème discrétisé est résolu à chaque pas par la méthode *UMFPACK*. Les profils à la surface au cours de l'équilibration (w_{eau} et w_{NaCl} à $z = L/2$) sont ensuite incorporés dans le modèle de croissance microbienne au travers des fonctions- γ (Équations (41) et (44)) en utilisant un script dans Matlab® (version 6.5, The MathWorks Inc.) pour générer les paramètres du modèle primaire, $\lambda(t)$ et $\mu_{\text{max}}(t)$, au cours de l'équilibration. La fonction *ode15s* de Matlab® est utilisée pour résoudre l'équation différentielle ordinaire non-linéaire (ODE pour « Ordinary Differential Equation » en anglais) donnant $N(t)$, la population de *L. sakei* à la surface de la viande à partir de la forme différentielle du modèle primaire de Huang (2008) (Équations (14) à (16)).

III. RÉSULTATS

III.1. COUPLAGE SUR ALIMENT RÉEL DE LA DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION À UNE FERMENTATION LACTIQUE DE SURFACE

III.1.1. INTRODUCTION

Dans le cadre de la construction du procédé innovant DII-fermentation-séchage, cette première étude sur aliment réel a pour but d'évaluer la faisabilité du couplage entre la DII et une fermentation de surface avec *L. sakei* : est-ce qu'il est possible de fermenter une viande pré-traitée par DII ?

Pour ce faire, l'influence de différents traitements de DII sur l'étape de fermentation est étudiée. Des filets de viande de bœuf sont soumis à trois traitements de DII distincts résultant en trois groupes de filets ayant des caractéristiques différentes en termes d'activité en eau, de teneur en sel et de teneur en sucres fermentescibles, puis inoculés avec *L. sakei*.

À l'issue de l'étape de DII, du fait notamment de temps d'immersion trop longs, les filets issus des traitements DII-30 et -40 présentaient des niveaux de charge microbienne trop importants. Pour cette raison, les résultats obtenus pour ces filets pendant l'étape de fermentation n'ont pas été développés dans l'article mais se retrouvent dans la section III.1.3.2 ci-après.

III.1.2. TEXTE DE LA PUBLICATION PARUE DANS JOURNAL OF FOOD SCIENCE : FEASIBILITY OF COUPLING DEHYDRATION-IMPREGNATION BY SOAKING TREATMENT OF MEAT WITH FERMENTATION BY *LACTOBACILLUS SAKEI*

Feasibility of Coupling Dehydration-Impregnation by Soaking Treatment of Meat with Fermentation by *Lactobacillus sakei*

Manuela Bros, Elodie Arnaud, Gérard Loiseau, Régine Talon, and Antoine Collignan

Abstract: This study examined the feasibility of coupling dehydration-impregnation by soaking (DIS) with a subsequent lactic fermentation in the treatment of meat. A series of beef fillets were subjected to 3 different DIS treatments. The resulting DIS-treated fillets had 3 different characteristics in terms of water activity, salt, and fermentable sugars contents. Fillets treated with the DIS with the shortest immersion time (5 h) and the highest salt concentration in the DIS bath (100 g/L) were inoculated with *Lactobacillus sakei*. A control group was left without inoculation. After 24 h incubation at 25 °C, only inoculated fillets showed signs of lactic fermentation. At 24 h, these fillets had a D-lactic acid content of 68 µmol/g dry basis and a high population of *L. sakei* revealed by methods of plate count and quantitative PCR. DIS could therefore be compatible with a subsequent fermentation step by *L. sakei*.

Keywords: dehydration, fermentation, *Lactobacillus sakei*, meat, salting

Practical Application: Traditional meat preservation processes often combine unit operations such as salting, smoking, fermentation, and drying. In tropical countries, high temperatures and high relative humidity, poor infrastructure, and improper slaughterhouse practices explain the need for more drastic processes (more salt, more water loss) for meat preservation. Dehydration-impregnation by soaking (DIS) could be used as a rapid pretreatment of meat, in order to counteract tropical conditions. This study validates a novel approach whereby DIS is coupled with lactic fermentation by surface inoculation with *Lactobacillus sakei*. With a final drying step this process could be used for the treatment of whole meat pieces.

Introduction

Traditional processes for meat preservation often combine unit operations such as salting, smoking, fermentation, and drying, following the concept of hurdle technology (Leistner 2000).

In Northern countries, nonthermal meat preservation processes, which combine lactic fermentation and/or ripening with a long drying period, are made possible either by climatic conditions (low temperature and moderate relative humidity) or by controlled temperature and humidity systems. These processes enable the production of shelf-stable and ready-to-eat products with intermediate moisture content and low salt content, such as well-known and much-appreciated dry sausages (for example, French *saucisson*, Spanish *chorizo*) or dried cured meats (for example, dried cured ham, Grison meat, beef jerky) (Campbell-Platt 1995; Zeuthen 2007).

In tropical countries, high temperatures and high relative humidity, poor infrastructure, and improper slaughterhouse practices explain the need for more drastic processes to preserve meat: more water loss, more salt, shorter treatment time, smaller meat pieces (Campbell-Platt 1995; Collignan and others 2008). As a result, in various cases, it is difficult to consume the product as it is. For example, South-African *biltong* can have a texture that is too leathery and hence not adapted to consumer preferences because it is sometimes over-dried (Nortjé and others 2005). French *boucané* and Brazilian *charque* have high levels of salt and are desalted before consumption (Collignan and others 2008). The making of *kilishi* in Sahel African countries includes a grilling step, which reduces high counts of spoilage microorganisms (Kalilou and others 1999).

This study is part of a global research that aims at developing a new process for the production of shelf-stable and ready-to-eat meat products with intermediate moisture content and low salt content in tropical conditions and without the need of an extensive cooling infrastructure. By combining the indispensable salting and drying operations with a controlled lactic fermentation step, it is possible to achieve additional product preservation hurdles, that is, competitive growth and production of organic acids and bacteriocins (Hutkins 2006) without resorting to pronounced salting or dehydration.

Dehydration-impregnation by soaking (DIS), a process based on the immersion of small pieces in concentrated solutions, could be an interesting alternative in tropical conditions for product

MS 20111389 Submitted 11/17/2012, Accepted 5/17/2012. Author Bros is with Université de Montpellier 2 Sciences et Techniques – UMR Qualisud Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier Cedex 5, France. Authors Bros and Arnaud are with CIRAD – UMR Qualisud, Pôle Qualité des Productions Agricoles et Alimentaires Institut des Régions Chaudes, BP 20,97408 Saint-Denis Messagerie Cedex 9, Réunion, France. Authors Loiseau and Collignan are with Montpellier SupAgro – UMR Qualisud, Institut des régions chaudes, 1101 avenue Agropolis, BP 5098, 34093 Montpellier Cedex 5, France. Author Talon is with INRA – UR454 Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France. Direct inquiries to author Bros (E-mail: manuela.bros@cirad.fr).

L. sakei fermentation of DIS-treated meat...

salting and drying. During immersion, water loss and solute gain take place simultaneously. Treatment with a concentrated ternary water/salt/sugar solution achieves effective water loss while reducing salt gain (Collignan and Raoult-Wack 1994). Collignan and others (2001) applied DIS to various meat and fish products and observed substantial and rapid water loss during the process; rapid prestabilization was thus obtained by impregnating with salt and lowering water activity. However, DIS alone is not sufficient and a subsequent drying step is always necessary to achieve a shelf-stable product. Furthermore, DIS also contributes to the formulation of the product with the impregnation of salt and fermentable sugars. Within the proper water activity range, this could favor the establishment of endogenous or added lactic acid bacteria (LAB). Thus, a process that combines DIS, fermentation and air drying could be a viable alternative for meat preservation. The process should be easy to implement in tropical developing countries and should enable the production of shelf-stable and ready-to-eat meat products with intermediate moisture content and low salt content.

The purpose of this study was to assess the feasibility of coupling DIS with subsequent lactic fermentation. The final drying operation as well as the use of typical curing ingredients leading to the desired end product were not addressed here. A series of beef fillets were treated by DIS followed by an inoculation with *Lactobacillus sakei*, a species commonly used as starter culture in European fermented products (Leroy and others 2006; Hufner and others 2007). The impact of DIS treatments on the characteristics of the fillets during the fermentation step was evaluated. The main focus was the evolution of D- and L-lactic acid contents, total microbial population, yeasts and molds, and LAB during the first 24 h of the fermentation process.

Materials and Methods

Overall process layout

Figure 1 shows the overall layout of the innovative process comprising the DIS treatment, fermentation step, and final air drying

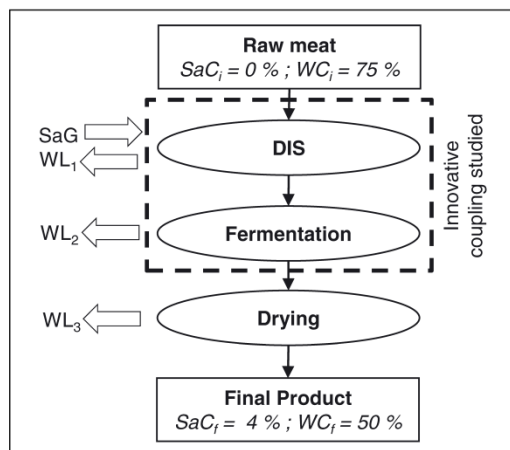


Figure 1—Overall process layout. SaC_i , WC_i = initial salt and water contents, SaG = salt gain, WL_1 , WL_2 , WL_3 = water loss during DIS, fermentation, and drying, respectively, SaC_f , WC_f = final salt and water contents.

operation. Final product characteristics were chosen within the range of intermediate moisture products (Nortjé and others 2005; Santchurn and others 2011), that is, a salt content of 4% wet basis (w.b.) and a water content of 50% w.b. Water loss and salt gain were determined taking into account both the initial and the final product characteristics (Figure 1). The salt gain during DIS was set at 2.2% initial mass, and the water loss that takes place during DIS, fermentation, and drying at 47% initial mass. After preliminary trials to modulate treatment times and salt concentrations in DIS baths, 3 distinct DIS treatments were developed (Table 1) leading to a salt gain fixed at 2.2% and 3 increasing levels of water loss: 20% initial mass for treatment DIS-20, 30% for DIS-30, and 40% for DIS-40. In future trials, the duration of the drying process will need to be modulated according to the remaining water loss and thus to the DIS treatment applied.

Meat fillet preparation

Fillets were cut from beef muscle *semitendinosus* (eye of round). The initial mass was 40.1 ± 5.6 g ($n = 51$ fillets). The shape of the fillets was set at $7 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ parallelepipeds, which was small enough for DIS treatments to be efficient (Rastogi and others 2002) and to enable extracting as many fillets as possible from a single muscle, thus reducing inter-sample variability (Santchurn 2009). Meat preparation was adapted from the protocol of Santchurn and others (2007). Fillets were stored at -18°C then thawed overnight at 4°C before DIS treatments.

DIS treatments

Three treatments, DIS-20, DIS-30, and DIS-40, were conducted and their characteristics are shown in Table 1. DIS baths were made by dissolving NaCl and dextrose equivalent 21 (DE21; Glucidex® IT21, Roquette, Lestrem, France) in water. DE21 is a glucose corn syrup which contains 1.4% w/w glucose (G1), 6.0% maltose (G2), 8.2% maltotriose (G3), and 7.5% maltotetraose (G4). Polysaccharides with a degree of polymerization higher than 10 glucose units account for 47.2% w/w. A detailed composition of DE21 can be found in the study of Santchurn and others (2007). At the end of DIS treatments, the fillets were removed from the baths, rinsed in sterile water, blotted dry, weighed, reconditioned into individual plastic bags, and placed at 4°C for 18 h to equilibrate sugar and salt concentrations within the fillets.

Fermentation

After this refrigeration period, fillets treated with DIS-20 were inoculated by dipping during 5 s into a suspension of the starter culture *Lactobacillus sakei*. The inoculation suspension of *L. sakei* was prepared at 10^9 CFU/mL in sterile water, 9 g/L of sodium chloride, 100 g/L of the commercial meat starter strain *L. sakei* Tradi 313 (Soussana, Thiais, France), and 5 g/L of Delvolid®.

Table 1—DIS conditions and desired mass transfers of treatments DIS-20, DIS-30, DIS-40.

DIS treatment		DIS-20	DIS-30	DIS-40
DIS treatment conditions	Time (h)	5	18	30
	Temperature ($^\circ\text{C}$)	25	25	25
	DE21 (g/L)	950	950	950
	NaCl (g/L)	100	75	87.5
Desired mass transfers	Water loss (% initial mass)	20	30	40
	Salt gain (% initial mass)	2.2	2.2	2.2

(DSM, Heerlen, Netherlands) to control growth of yeasts and molds. *L. sakei* produces both D and L isomers of lactic acid (Champomier-Vergès and others 2002).

In order to verify the impact of the inoculation with the starter culture, a control group was constituted of 3 fillets treated with DIS-20 and left without inoculation.

Finally, all fillets, inoculated and control, were arranged using a row of stainless steel hooks. The fillets were placed in a climatic chamber (Model CL, BIA, Conflans Sainte Honorine, France) at 25 °C, 98% RH for 24 h.

Sampling method

Samples were taken before and after DIS treatments, after inoculation with *L. sakei* (0 h), after 12 h and 24 h incubation, and for the control group after 24 h incubation only. For each sampling time, 3 fillets were analyzed. To perform microbial counts, a 1 cm × 1 cm × 1 cm (3 g) cube of meat was taken in sterile conditions at the center of the fillet. It was used to sample both the lower and upper surfaces and was sufficient in size to be representative of the whole fillet. The rest of the fillet was ground in a domestic food-processor for physicochemical analysis.

Physicochemical analysis

Moisture content determination was adapted from French standard NF V04-401 (AFNOR 1968) by placing a 10 g sample at 103 °C and atmospheric pressure until stable weight (24 h). Water activity was measured at 25 °C using a Fast-Lab water activity meter (GBX, Romans, France). Salt content was determined with a Model 926 chloride analyzer (Sherwood Scientific, Cambridge, UK) after a 2-h cold extraction in 0.3 N nitric acid (Bohuon 1995). For pH measurements, 3-g samples were homogenized with 27 mL of distilled water during 30 min. pH was measured with a TitroLine[®] easy titrator (SI Analytics GmbH, Mainz, Germany). To determine D- and L-lactic acid, and D-glucose contents, enzymatic kits (Enzytec[™], SCIL Diagnostics GmbH, Viernheim, Germany) were used on filtered extracts (porosity ϕ 25 μ m). These extracts were obtained by treating the samples with Carrez reagents to precipitate proteins. A 2.5-g sample was placed in a 50-mL vial containing 30 mL of distilled water; 2.5 mL each of Carrez solutions I (3.6% w/v $C_6FeK_4N_6$, 3H₂O) and II (7.2% w/v ZnSO₄ · 7H₂O), and 5 mL of 0.1 N sodium hydroxide were added successively before completing to 50 mL with distilled water.

Microbial counts

The sample was placed in a Stomacher ST3 laboratory blender (ATL, Laboratoires Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, France) for 8 min at 240 rpm with sterile peptone water 10% w/v (Oxoid, Cambridge, UK). Then, tenfold dilutions were made in sterile physiological water (NaCl 9 g/L). Total microbial population count was performed by pour-plating (1 mL) on PCA medium (Oxoid, Cambridge, UK). Lactic acid bacteria were counted by surface-spreading (0.1 mL) on de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS, Oxoid, Cambridge, UK) and yeasts and molds on Sabouraud-Chloramphenicol agar (Oxoid, Cambridge, UK). All plates were incubated in aerobic conditions at 30 °C for 48 h. For each dilution, the culture was done in duplicate.

Quantitative PCR

The quantitative PCR (qPCR) technique was used to quantify specifically populations of *L. sakei*. DNA extractions were performed according to the protocol of Leasing (2005) from pure

cultures of *L. sakei* Tradi 313 on MRS medium and from meat samples.

Quantitative PCR was performed on DNA extracts in an Mx3005P[™] Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., U.S.A.). The Brilliant SYBR[®] Green Side Step qPCR Master Mix (Agilent Technologies) was used in a 25- μ L reaction volume with forward and reverse primers. The sequences of the primers (sakF 5'-GATAAGCGTGAGGTCGATGGTT3'/sakR 5'-GAGCTAATCCCCCATAATGAACTAT3') were designed to amplify a 78-bp fragment of the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS) region of *L. sakei* and enabled specific detection of 52 different *L. sakei* strains isolated from several fermented meat products (Martin and others 2006).

Data analysis

Water loss, and salt and glucose gains were calculated following the formulas given by Santchurn and others (2007). The statistical analysis was performed with Statistica[™] program, version 7.0 (StatSoft, Tulsa, Okla., U.S.A.). In the analysis of variance (ANOVA), Fisher's least significant difference was used in post hoc analysis to constitute homogenous groups with a level of significance of 95% ($\alpha = 0.05$).

Results and Discussion

DIS impact on product characteristics

The top half of Table 2 shows the mass transfers obtained during the 3 treatments. Water losses of 20.5%, 31.0%, and 38.3% initial mass were in line with the target values of 20%, 30%, and 40% initial mass for treatments DIS-20, DIS-30, and DIS-40, respectively. Also, for the 3 treatments the salt gain averaged at 2.2% initial mass as planned. Mass transfers resulted, after DIS, in the product characteristics shown in the bottom half of Table 2. Three significantly different levels of water activity were obtained: fillets treated by DIS-20 had the highest water activity (0.975), followed by DIS-30 (0.970), then DIS-40 (0.956). Water and salt contents were consistent with water activity values: highest water content and lowest salt content for fillets treated by DIS-20 (highest a_w), and lowest water content and highest salt content for fillets treated by DIS-40 (lowest a_w). This is consistent with the study by Van der Sman and Boer (2005) who reported that at high water activity values,

Table 2—Mass transfers and characteristics of meat fillets before and after DIS treatments.

Mass transfers (% initial mass)					
	n	WL	SaG	SuG	GluG
DIS-20	6	20.5 ± 0.8 ^a	2.2 ± 0.1 ^{ab}	1.3 ± 0.3 ^a	0.08 ± 0.1 ^a
DIS-30	6	31.0 ± 3.9 ^b	2.1 ± 0.2 ^a	3.7 ± 0.4 ^b	0.04 ± 0.03 ^{ab}
DIS-40	3	38.3 ± 3.1 ^c	2.3 ± 0.2 ^b	3.0 ± 0.5 ^b	-0.05 ± 0.04 ^b
Product characteristics (% w.b.)					
	n	a_w	WC	SaC	GluC
Before	15	1.000 ± 0.001 ^a	74.5 ± 0.6	0.07 ± 0.01	0.30 ± 0.14
DIS-20	6	0.975 ± 0.001 ^b	64.9 ± 0.8	2.72 ± 0.12	0.51 ± 0.09
DIS-30	6	0.970 ± 0.003 ^c	58.8 ± 1.5	2.86 ± 0.25	0.45 ± 0.07
DIS-40	3	0.956 ± 0.002 ^d	53.6 ± 1.3	3.61 ± 0.10	0.53 ± 0.08

DIS-20, DIS-30, DIS-40: see Table 1 for the DIS treatment characteristics. WL = water loss, SaG = salt gain, SuG = total sugar gain, GluG = D-glucose gain, a_w = water activity, WC = water content, SaC = salt content, GluC = D-glucose content, n: number of fillets. The intervals shown are the standard deviation calculated using the number of fillets (n) on each line. Within one column, different superscript letters show significant difference at 95%.

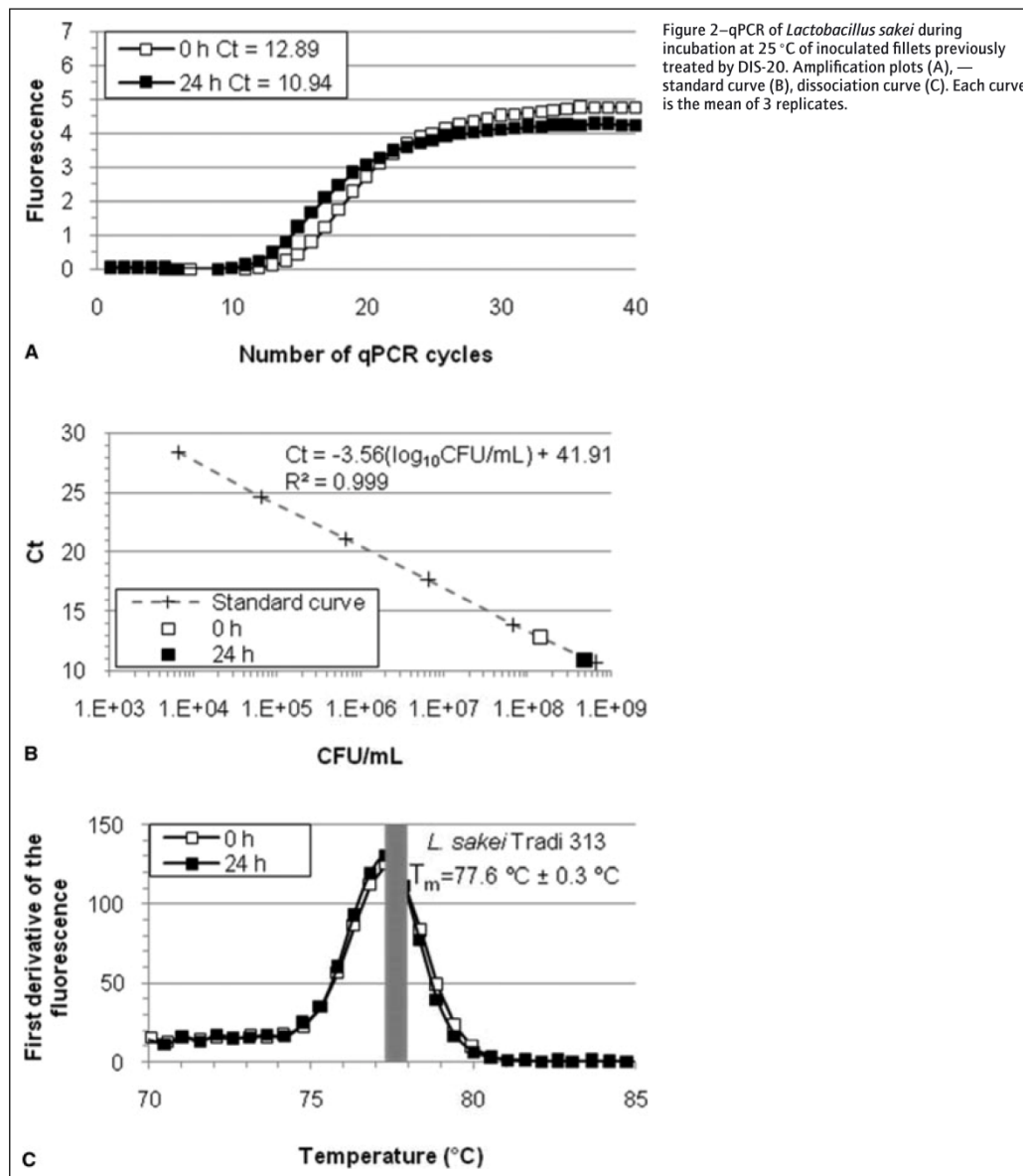
L. sakei fermentation of DIS-treated meat...

water activity depended only on salt concentration in the water of the meat as the effect of the food matrix on solutes was negligible.

D-glucose gains were negligible for all treatments and the D-glucose content was similar for all fillets (Table 2). However, the glucose value could result from simultaneous phenomena. First, during DIS, the fillets were impregnated not only with glucose but also with maltose, maltotriose, and more complex sugars contained in the DE21 syrup (Santchurn and others 2007). Second,

the microbial development which occurred during DIS treatments (Table 3), and which is commented hereafter, resulted in consumption of D-glucose. In parallel, microorganisms naturally present in the meat could have had the ability to hydrolyze complex sugars into maltose which in turn was hydrolyzed into glucose units. This is the case for LAB (Calderon Santoyo and others 2003).

The microbial population was evaluated just before DIS treatments, after the meat was cut into fillets, stored at -18°C and then thawed overnight at 4°C . The total microbial population



was high whereas the yeasts and mold and LAB populations were moderate before DIS treatments (Table 3). After DIS, there was an increase in the microbial population for the 3 treatments. However, fillets treated by DIS-20 showed significantly lower counts for the total microbial population, as well as for yeasts and molds and LAB compared to fillets treated by DIS-30 and DIS-40.

Different studies show that DIS conditions (that is, salt and sugar concentrations in the baths, treatment time, and temperature) have an impact on both the physicochemical and microbiological characteristics of the fillets. Deumier and others (1996) used a DIS

Table 3—Microbial populations of fillets, before and after treatments DIS-20, DIS-30, and DIS-40.

log CFU/g	n	Before DIS	After DIS
Total microbial population (PCA)			
DIS-20	3	5.8 ^a	6.0 ^a
DIS-30	3	7.1 ^b	8.4 ^{cd}
DIS-40	3	6.0 ^a	8.8 ^d
Yeasts and molds (SAB)			
DIS-20	3	2.4 ^a	2.9 ^{bc}
DIS-30	3	2.8 ^{bc}	3.8 ^d
DIS-40	3	2.7 ^{ab}	4.9 ^e
Lactic acid bacteria (MRS)			
DIS-20	3	3.3 ^a	5.1 ^c
DIS-30	3	4.0 ^b	6.4 ^d
DIS-40	3	4.2 ^b	6.7 ^d

Statistical analysis was performed separately for the 3 mediums; different superscript letters show significant difference at 95%. n: number of fillets.

treatment of 15 h at 10 °C in a bath with 183 g/L of salt and 1503 g/L of DE38 corn syrup to achieve 47.2% water loss, 2.3% salt gain, and minimal sugar gain. In their conditions, the microbial load was reduced by 1 log CFU/g which contradicts our results. In our study, DIS treatments were conducted at 25 °C instead of 10 °C in order to be compatible with production in tropical conditions. Moreover, in order to achieve targeted water losses and salt gain, DIS baths used lower salt concentrations than in Deumier and others (1996), and treatment times greatly differed from one DIS treatment to another, that is, 5, 18, and 30 h for DIS-20, DIS-30, and DIS-40, respectively (Table 1). As a consequence, the microbial development that occurred during treatments DIS-30 and DIS-40 (Table 3) was not acceptable. Fillets treated by DIS-20, with the shortest treatment time (5 h) and highest salt concentration in the DIS bath (100 g/L), were the only ones used in the fermentation trials.

Evolution of fillets treated with DIS-20 during the fermentation step

With the inoculation of *L. sakei* starter, the total microbial population of meat fillets reached 8.0 log CFU/g at 0 h and LAB counts 6.9 log CFU/g (Table 4). Yeasts and molds counts remained at acceptable low levels (around 3 log CFU/g) throughout incubation in accordance with Delvolid[®] specifications. After 24 h incubation at 25 °C, the total microbial population had

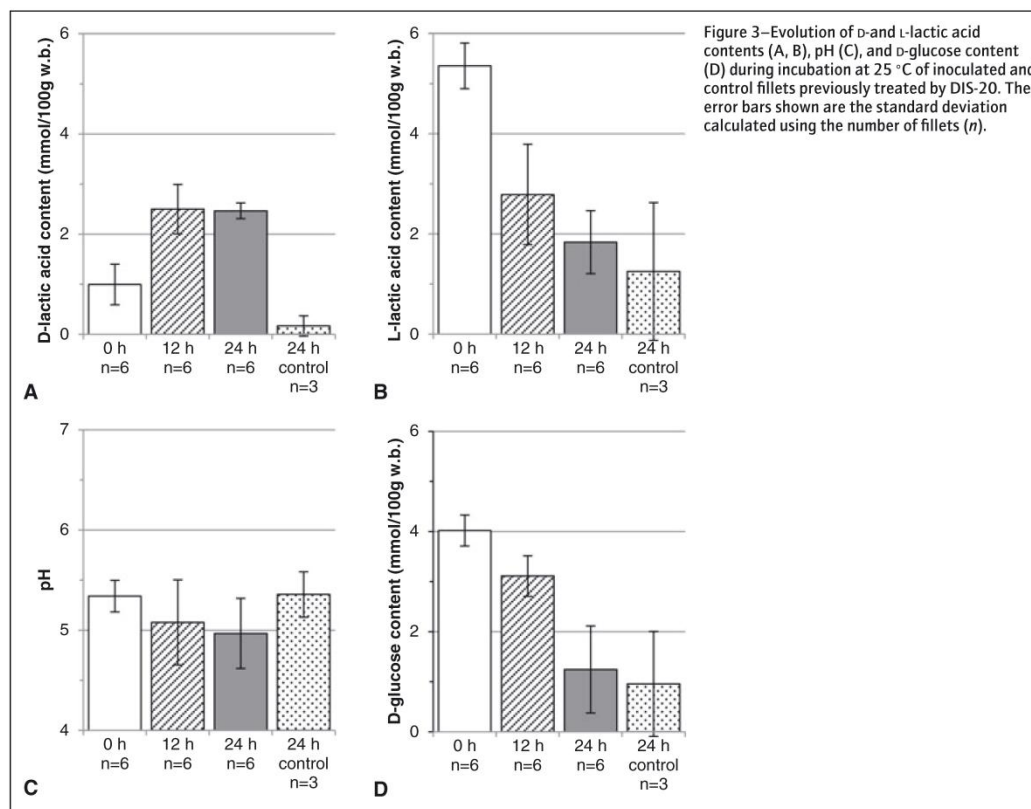


Figure 3—Evolution of D- and L-lactic acid contents (A, B), pH (C), and D-glucose content (D) during incubation at 25 °C of inoculated and control fillets previously treated by DIS-20. The error bars shown are the standard deviation calculated using the number of fillets (n).

L. sakei fermentation of DIS-treated meat...

increased to 9.1 log CFU/g and LAB to 7.7 log CFU/g. In fillets from the control group, only the total microbial population was evaluated after 24 h incubation and it reached a very high level of 12 log CFU/g.

Because of the presence of endogenous lactic acid bacteria on the meat, qPCR was used to quantify specifically the population of *L. sakei* in inoculated samples at 0- and 24 h incubation (Figure 2). The amplification curve (Figure 2A) plots the fluorescence against the number of qPCR cycles in accordance with the population of *L. sakei* in meat samples. Tenfold dilutions were made from DNA extracts of a pure culture of *L. sakei* Tradi 313 incubated at 30 °C in MRS broth in order to obtain the standard curve (Figure 2B) which plots quantitative values (CFU/mL) vs. the cycle threshold value (Ct). The Ct values of meat samples determined in Figure 2A were then used to calculate the corresponding populations of *L. sakei* (CFU/g). The dissociation curve (Figure 2C) peaks at the melting temperature (T_m), characteristic of *L. sakei*. The low Ct values (Figure 2A) show that the qPCR conditions and primers used specifically amplified *L. sakei* in meat samples. The *L. sakei* population just after inoculation was 4.1×10^8 CFU/g. After 24 h, the *L. sakei* population increased to 1.5×10^9 CFU/g. The dissociation curve (Figure 2C) showed a single peak for 24-h samples, suggesting the presence of only one strain of *L. sakei*. In addition, the T_m value was similar to the pure culture of *L. sakei* Tradi 313 (77.6 ± 0.3 °C). Given the high inoculation level, these results suggested that the inoculated *L. sakei* was dominant at 24 h.

Figure 3 shows the physicochemical characteristics of the fillets during the 24 h incubation period. In inoculated fillets, a significant increase in D-lactic acid content was measured, reaching an average of 2.40 mmol/100 g of meat w.b. at 24 h (Figure 3A). The lactic acid of the D form measured in these fillets was undoubtedly the result of bacterial fermentation because the lactic acid originally present in the meat was exclusively of the L form. This D-lactic acid concentration was equivalent to 68 µmol/g dry basis and was comparable to that of 40 to 50 µmol/g dry basis for French dry sausages as reported by Montel and others (1993). L-lactic acid decreased during incubation (Figure 3B). This tendency was also measured by Mercier and others (1989) during ripening of Grison meat and could be explained by the presence of other floras able to metabolize organic acids. The consumption of L-lactic acid being more important than the production of the D form, there was a global decrease of 3.04 mmol/100 g of meat w.b. in the lactic acid content. Despite the fact that other organic acids were not measured, this could explain the nonsignificantly different pH values (Figure 3C). D-glucose content at 0 h incubation was 4.02 ± 0.31 mmol/100 g of meat w.b. in fillets treated with DIS-20 (Figure 3D). This corresponds to 7 g/kg, which is in accordance with the value of 1 to 8 g/kg reported by Garriga and Aymerich (2007) for the manufacture of fermented sausages. The decrease in D-glucose content during incubation could be caused by its

consumption by microbial metabolism. In 24-h control fillets, L-lactic acid content, pH, and D-glucose content were not significantly different from those of inoculated fillets. However, unlike inoculated fillets, only negligible amounts of D-lactic acid (0.16 mmol/100 g w.b.) were measured at 24 h incubation. This, in conjunction with the high microbial counts observed in control fillets, suggested that within the framework of this study, under the DIS treatment conditions used, an inoculation with a commercial starter was necessary to begin fermentation.

Thus, in fillets treated with DIS-20 and inoculated with *L. sakei*, lactic fermentation was made possible either by the water activity value, highest of the 3 DIS treatments, and/or by the lower level of contamination of the meat during DIS (shortest treatment 5 h, highest concentration of salt 100 g/L in the DIS bath). Also, these results showed the complexity of working with meat (1) because of the heterogeneity of its physicochemical characteristics and its endogenous flora, (2) because the formulation of whole meat pieces in terms of treatment time and solute gain had an impact on the flora. Finally, the interpretation of the results of D- and L-lactic acid and D-glucose contents was also complex; they could result from the equilibrium between production and consumption mechanisms that occurred simultaneously. D- and L-lactic acid contents of the processed meat resulted from the initial levels present in the meat, the leakage into the DIS bath during treatment, the production by LAB, and the consumption by spoilage bacteria, and yeasts and molds. For D-glucose, the contents resulted from the equilibrium between the initial impregnation by DIS, the kinetics of appearance caused by microbial hydrolysis, and the kinetics of consumption caused by microbial catabolism.

Conclusions

This study confirmed the possibility of coupling DIS with subsequent lactic fermentation. However, this combination was only feasible under 2 conditions. First, DIS treatment should be short, permit impregnation of fermentable sugars, and lead to moderate dehydration and NaCl impregnation. Second, an inoculation with a commercial *L. sakei* starter is necessary, as shown by the non-fermentation of control fillets.

The heterogeneity of the meat and its endogenous flora as well as the complexity of the simultaneous mechanisms that take place during DIS and fermentation justify the need for a more controlled experimental device. Model foods should be used in further research in order to better understand the simultaneous mechanisms that take place during the fermentation step of a DIS treated matrix.

Finally, this study also showed the need to adjust DIS to counteract the proliferation of spoilage microorganisms. In the future, DIS parameters should be selected to incorporate more drastic conditions: shorter treatment time with higher salt content in DIS bath, and better impregnation of fermentable sugars. This would steer the subsequent fermentation step toward the desired result: rapid growth of lactic acid bacteria and sufficient levels of lactic acid to constitute additional hurdles that protect the product. Once coupling between DIS and fermentation is optimized, the final drying step can be performed and the meat preservation process completed. Then both challenge-test trials and a sensory analysis should be carried out to assess the entire process—DIS, fermentation, drying—capability to inhibit pathogen growth, and produce a novel shelf-stable and ready-to-eat product that will suit the consumer.

Table 4—Microbial populations during incubation at 25 °C of inoculated fillets previously treated by DIS-20.

log CFU/g	n	0 h	24 h
Total microbial population (PCA)	3	8.0 ^a	9.1 ^{bc}
Yeasts and molds (SAB)	3	2.6 ^a	3.3 ^b
Lactic acid bacteria (MRS)	3	6.9 ^a	7.7 ^b

Statistical analysis was performed separately for the 3 mediums; different superscript letters show significant difference at 95%. n: number of fillets.

Acknowledgment

The authors wish to thank the Conseil Régional de La Réunion who provided financial support for this study.

References

- AFNOR. 1968. NF V04-401. Viandes et produits à base de viande. Détermination de l'humidité. Recueil de normes "Produits de l'Agriculture". Paris, France: Association Française de Normalisation. pp. 45-47.
- Bohuon P. 1995. Déshydratation-imprégnation par immersion en solutions ternaires: étude des transports d'eau et de solutés sur gel et produits d'origine animale. PhD thesis. Montpellier: Université de Montpellier 2. p. 216.
- Calderon Santoyo M, Loiseau G, Rodriguez Sanoja R, Guyot JP. 2003. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and [alpha]-amylase production at pH 4.0. *Int J Food Microbiol* 80(1):77-87.
- Campbell-Platt G. 1995. Fermented meats - a world perspective. In: Campbell-Platt G, Cook, PE, editors. *Fermented meats*. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional. pp. 39-52.
- Champomier-Vergès MC, Chaillou S, Cornet M, Zagorec M. 2001. "Lactobacillus sakei: recent developments and future prospects". *Res Microbiol* 152(10):839-848.
- Collignan A, Bohuon P, Deumier F, Poligné I. 2001. Osmotic treatment of fish and meat products. *J Food Eng* 49(2-3):153-62.
- Collignan A, Raoult-Wack AL. 1994. Dewatering and salting of cod by immersion in concentrated sugar/salt solutions. *LWT Food Sci Technol* 27(3):259-64.
- Collignan A, Sanchurn SJ, Zakhia N. 2008. Dehydration of muscle foods. In: Hui YH, Clary C, Faid M, Fasina O, Noomhorn A, Welti-Chanes J, editors. *Food drying science and technology: microbiology, chemistry, application*. Lancaster: DEStech Publications Inc. p. 721-44.
- Deumier F, Zakhia N, Collignan A. 1996. Formulation of a cured meat product by the dewatering-imprégnation soaking (DIS) process: Mass transfer study and assessment of product quality. *Meat Sci* 44(4):293-306.
- Garriga M, Aymerich T. 2007. The microbiology of fermentation and ripening. In: Toldrá F, editor. *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p. 125-35.
- Hufner E, Markleton T, Chaillou S, Crutz-Le Coq AM, Zagorec M, Hertel C. 2007. Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Appl Environ Microbiol* 73(8):2522-31.
- Hutkins RW. 2006. Meat fermentation. Microbiology and technology of fermented foods. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. p. 207-32.
- Kailou S, Giroux F, Zakhia N, Bimbenet JJ. 1999. Etude microbiologique et amélioration du procédé traditionnel de transformation de la viande en kilishi. *Sci Aliment* 19: 235-45.
- Leessing R. 2005. Identification et validation de marqueurs spécifiques pour la traçabilité de poissons d'aquaculture lors de leur import-export. PhD thesis. Montpellier: Université de Montpellier II. p. 183.
- Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol* 55(1-3):181-86.
- Leroy F, Verluyn J, De Vuyst L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int J Food Microbiol* 106(3):270-85.
- Martin B, Jofre A, Garriga M, Pla M, Aymerich T. 2006. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 72(9):6040-48.
- Mercier GP, Schmitt RE, Schmidt-Lorenz W. 1989. Studies on ripening of Bündnerfleisch, Untersuchungen über die Reifung von Bündnerfleisch. *Fleischwirtschaft* 69(10): 1593-98.
- Montel MC, Talon R, Berdagué JL, Cantonnnet M. 1993. Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of French dry sausages. *Meat Sci* 35(2):229-40.
- Nortjé K, Buys EM, Minnaar A. 2005. Effect of [gamma]-irradiation on the sensory quality of moist beef biltong. *Meat Sci* 71(4):603-11.
- Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Niranjana K, Knorr D. 2002. Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends Food Sci Technol* 13(2): 48-59.
- Sanchurn SJ. 2009. Analyse et compréhension des mécanismes de transferts de matière lors de l'immersion d'une pièce de viande dans une solution complexe : étude expérimentale et modélisation. PhD thesis. Saint Denis, La Réunion, Université de la Réunion. p. 203.
- Sanchurn SJ, Arnaud E, Zakhia-Rozis N, Collignan A. 2011. Drying: principles and applications. In: Hui, YH, editor. *Handbook of meat and meat processing*. Boca Raton: CRC Press. p. 505-22.
- Sanchurn SJ, Collignan A, Trystram G. 2007. Impact of solute molecular mass and molality, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution. *J Food Eng* 78(4):1188-201.
- Van der Siman RGM, Boer E. 2005. Predicting the initial freezing point and water activity of meat products from composition data. *J Food Eng* 66(4):469-75.
- Zeuthen P. 2007. A historical perspective of meat fermentation. In: Toldrá, F, editor. *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p. 3-8.

III.1.2.1. ERRATUM

Table 1. DIS conditions and desired mass transfers of treatments DIS-20, DIS-30, DIS-40.

	DIS treatment	DIS-20	DIS-30	DIS-40
DIS treatment conditions	Time (h)	5	18	30
	Temperature (°C)	25	25	25
	DE 21 (g/kg water)	950	950	950
	NaCl (g/kg water)	100	75	87.5
Desired mass transfers	Water loss (% initial mass)	20	30	40
	Salt gain (% initial mass)	2.2	2.2	2.2

Dans l'article, l'unité des contenus en sel et en DE 21 des solutions de DII était par erreur le g/l alors qu'il s'agissait de g/kg d'eau.

III.1.3. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

III.1.3.1. RÉSULTATS DÉVELOPPÉS DANS L'ARTICLE

À la fin des 24 h d'incubation, seuls les filets inoculés issus de la DII-20 (temps le plus court et teneur en sel la plus élevée dans la solution d'immersion) montraient des signes de fermentation. Les filets témoins, issus du même traitement de DII mais non-inoculés ne montraient pas de signes de fermentation.

Ces signes étaient une teneur en acide D-lactique de 68 $\mu\text{mol/g}$ (b.s.) (la forme D- est forcément issue du métabolisme bactérien étant donné que seule la forme L- se trouve dans la viande) et une population élevée de *L. sakei* révélée par dénombrement sur milieu MRS et par PCR quantitative.

III.1.3.2. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

La Figure 16 reprend dans le premier groupe de chaque sous-graphique, les résultats des filets issus de la DII-20 (et les témoins) présentés dans l'article, mais montre aussi le devenir des filets issus des DII-30 et -40 pendant l'étape de fermentation.

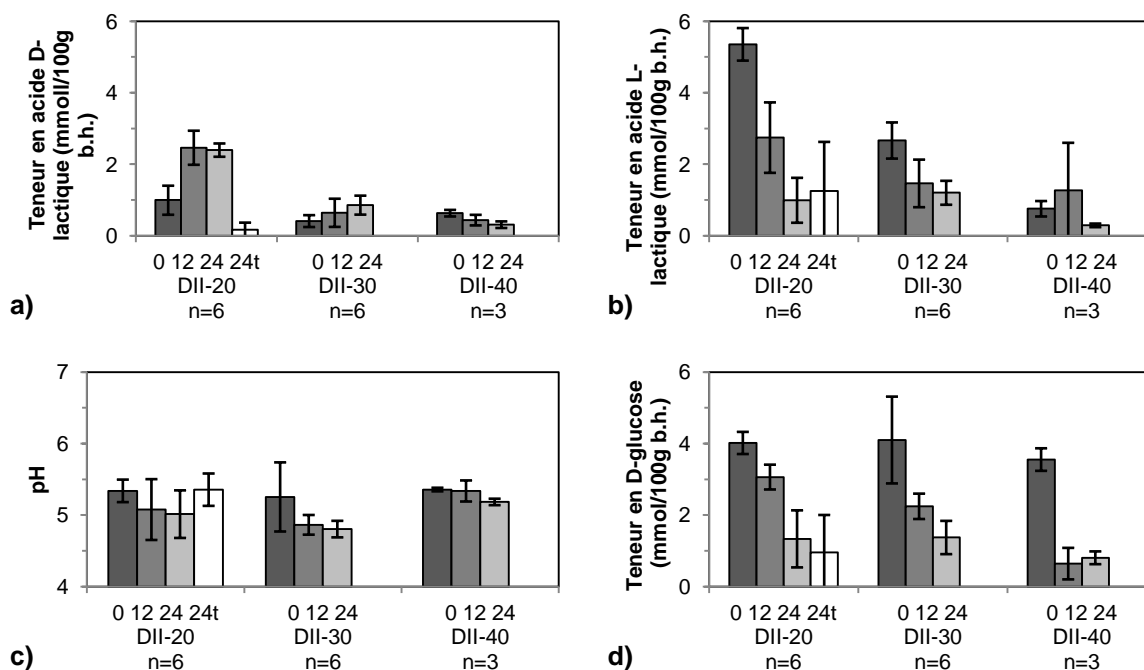


Figure 16. Évolution de la teneur en acide D-lactique (a), la teneur en acide L-lactique (b), le pH (c) et la teneur en D-glucose (d) pendant l'incubation à 25 °C des filets issus des traitements de Déshydratation-Imprégnation par Immersion DII-20, -30 et -40, ainsi que les témoins à 24 h issus du traitement DII-20 (24t). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur les n filets de chaque groupe.

Les teneurs en acide D-lactique des filets inoculés issus des DII-30 et -40 sont significativement inférieures à celles retrouvées dans les filets inoculés issus de la DII-20. Ceci confirme les résultats annoncés dans l'article à savoir que seuls les filets inoculés issus de la DII-20 présentent des signes de fermentation.

En ce qui concerne l'acide L-lactique, on observe la même tendance à la diminution pour les filets issus des trois traitements. Cependant, il est apparent que la teneur à 0 h est plus importante pour les filets issus de la DII-20 (5,36 (0,45)) puis -30 (2,67 (0,51)) puis -40 (0,76 (0,22)). Ceci pourrait s'expliquer par la différence des temps d'immersion, à savoir 5 h, 18 h et 30 h respectivement pour les DII-20, -30 et -40, qui induirait une perte de plus en plus prononcée des solutés propres de la viande dont fait partie l'acide L-lactique.

Enfin, en ce qui concerne le pH et la teneur en D-glucose, les filets issus des DII-30 et -40 se comportent de la même façon que ceux issus de la DII-20. Le pH ne varie pas de manière significative et le glucose est consommé par l'activité bactérienne.

III.1.3.3. CONCLUSION

L'intérêt de coupler la DII à une fermentation de surface a bien été validé dans cette première étude mais celle-ci met aussi en évidence le besoin d'approfondir la connaissance sur les facteurs influençant la croissance en surface de *L. sakei* afin de mieux définir les conditions opératoires de l'étape de DII qui précède la fermentation. Aussi, étant donné la complexité de l'étude sur aliment réel du fait de l'hétérogénéité de la matière première, de la présence d'une flore endogène hétérogène aussi et de la difficulté de formuler à souhait un morceau de viande, le choix s'est tourné vers un travail mieux maîtrisé sur aliment-modèle. Il s'agit de concevoir un dispositif expérimental afin d'étudier spécifiquement la croissance en surface de *L. sakei* dans un milieu maîtrisé en fonction de facteurs environnementaux pertinents vis-à-vis du couplage DII-fermentation. Des outils de modélisation seront utilisés pour décrire les cinétiques de croissance en surface et les effets des facteurs environnementaux sur ces cinétiques.

III.2. ÉTUDE EN MILIEU MODÈLE DE LA CROISSANCE EN SURFACE DE *LACTOBACILLUS SAKEI*

III.2.1. INTRODUCTION

La croissance de *L. sakei* en surface d'un milieu modèle est étudiée en fonction de facteurs environnementaux qui traduisent l'évolution des caractéristiques de la viande soumise au couplage DII-fermentation soit : l'activité en eau et la teneur en sel modifiées par DII et le pH et la teneur en acide lactique non-dissocié modifiés par le métabolisme fermentaire. Dans le cas de la croissance de *L. sakei* en surface d'une viande ou d'un milieu modèle, il est difficile de caractériser expérimentalement l'évolution de la composition de la surface au cours du temps en raison des phénomènes de diffusion des solutés impliqués et du manque de techniques de mesure simples. À cette difficulté s'ajoute l'impossibilité de découpler les effets de l'activité en eau et la teneur en sel, de ceux du pH et de l'acide lactique non-dissocié modifiés par le métabolisme fermentaire. Ces arguments nous conduisent à envisager l'étude de la croissance de *L. sakei* en surface d'un milieu modèle mais avec une méthodologie différente de celle retrouvée dans la littérature, qui s'est jusqu'alors attachée à mesurer la croissance en surface de géloses. Ainsi, l'étude se poursuit par la conception et l'utilisation d'un dispositif expérimental permettant de construire des cinétiques de croissance en surface de *L. sakei* :

- en conditions maîtrisées en l'absence d'autres flores,
- avec une formulation simple du milieu en termes d'activité en eau, de teneur en sel, de pH ou de teneur en acide lactique non-dissocié,
- et en s'affranchissant de l'accumulation de métabolites toxiques (comme l'acide lactique) autour des cellules bactériennes.

Les cinétiques obtenues sont traitées à l'aide d'outils de microbiologie prévisionnelle : le modèle primaire de Huang (2008) et le γ -concept (Section I.3).

III.2.2. TEXTE DE LA PUBLICATION SOUMISE À FOOD MICROBIOLOGY: USE OF AN ORIGINAL DEVICE TO MODEL THE EFFECTS OF WATER ACTIVITY, SALT, PH, AND LACTIC ACID ON *LACTOBACILLUS SAKEI* SURFACE GROWTH

Use of an original device to model the effects of water activity, salt, pH, and lactic acid on *Lactobacillus sakei* surface growth

Manuela Bros^{a,b}, Elodie Arnaud^{b,*}, Philippe Bohuon^c, Gérard Loiseau^c, Régine Talon^d, Antoine Collignan^c

^a Université de Montpellier 2 Sciences et Techniques – UMR Qualisud, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^b Cirad – UMR Qualisud, Pôle qualité des productions agricoles et alimentaires, BP 20, 97408 Saint-Denis Messagerie Cedex 9, Réunion, France

^c Montpellier SupAgro – UMR Qualisud, Institut des Régions Chaudes, 1101 avenue Agropolis, BP 5098, 34093 Montpellier Cedex 5, France

^d Inra – UR454 Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Abstract

This work aims to study the growth of *Lactobacillus sakei* on a model surface as a function of water activity (a_w), NaCl concentration ([NaCl]), pH and non-dissociated lactic acid concentration ([LaH]) by means of an experimental device specifically conceived for this purpose. Surface growth trials were conducted on the original experimental device using a culture medium formulated to mimic the formulation of fermented meat products. Growth curves were interpreted by a two-step modelling approach with models inspired from the Baranyi & Roberts model and the γ -concept. For each of the four environmental factors, growth/no-growth boundaries were determined: $a_w = 0.94$, [NaCl] = 7 % (w/v), pH = 4.00 and [LaH] = 0.5 % (w/v). Growth curves were satisfactorily fitted to the primary model. By means of the γ -concept, guidelines on the effect of the environmental factors on the duration of the lag phase and on the maximum specific growth rate were constructed and dual effects of salt and lactic acid were demonstrated. This experimental device has potential to be a good tool to study other situations by changing the microorganism and/or the culture medium.

Highlights

- Conception of a novel device to study surface growth kinetics of microorganisms
- *Lactobacillus sakei* growth intervals as a function of a_w , salt, pH and lactic acid
- γ -concept applied to lag phase and maximum specific growth rate
- γ -concept extension to show dual effect of salt and lactic acid

Keywords

Lactobacillus sakei; predictive microbiology; fermented meat products; surface growth; NaCl; lactic acid

Nomenclature

a_w	[-]	water activity
[LaH]	[% (w/v)]	non-dissociated lactic acid concentration
N	[CFU/cm ²]	number of cells per square centimeter at t
n_p	[-]	number of parameters
n_t	[-]	number of data points
MSE	[-]	mean squared error
$RMSE$	[-]	root mean squared error
t	[h]	time
$y(t)$	[-]	natural logarithm of the number of N
\hat{y}	[-]	simulated natural logarithm of N
Greek symbols		
α	[-]	curvature parameter of transition from lag to exponential phase
γ	[-]	function describing the effect of environmental factors on primary model parameter (μ_{\max}, λ)
λ	[h]	duration of the lag phase
μ_{\max}	[h ⁻¹]	maximum specific growth rate
Subscripts		
0		initial time ($t = 0$)
max		maximal time ($t = \infty$)
ref		reference trial

1. Introduction

Lactobacillus sakei, an endogenous meat bacteria, is commonly used in Europe as a starter in dried-cured-fermented sausages processing owing to its adaptation to the meat environment and conditions prevailing in sausage batter (Leroy *et al.*, 2006; Hüfner *et al.*, 2007). *L. sakei* was used in prior research (Bros *et al.*, 2012) in the conception of an innovative process to produce a shelf-stable, ready-to-eat, intermediate-moisture, fermented meat-product. First, small meat pieces were treated by Dehydration-Impregnation by Soaking (DIS) using a concentrated ternary water-salt-sugar immersion solution. Thus, the meat was pre-stabilized by lowering the water activity by water loss and salt gain and was formulated by incorporating glucose as a rapidly fermentable sugar. Then, DIS-treated meat pieces were surface-inoculated with *L. sakei*. A final air-drying operation should modulate final product water and salt contents and flavor compounds issuing from fermentative metabolism. The challenge lies in coupling DIS and fermentation so that formulation by DIS favors a rapid colonization of the meat surface by *L. sakei*. Within this framework, the surface growth of *L. sakei* is influenced by water activity and salt content, modified by DIS, and by local pH and lactic acid content, modified by bacterial metabolism.

In DIS, using ternary water-salt-sugar immersion solutions achieves an effective water loss while reducing salt gain with the impregnation of sugars (Collignan & Raoult-Wack, 1994; Santchurn *et al.*, 2007). Hence, the resulting water activity of the product cannot be explained by the sole addition of salt but includes the sugars due to their osmo-depressant quality. Moreover, several authors have underlined a specific effect of NaCl (Tempest & Meers, 1968; Neysens *et al.*, 2003; Theys *et al.*, 2010) in addition to its known osmo-depressant quality. Consequently, water activity and salt needed to be studied as separate factors. During fermentation, *L. sakei* growing on the meat surface produces lactic acid. If this acid accumulates on the surface around the bacterial cells, it impairs growth due to the lowering of the pH and to the toxicity of the non-dissociated form (Brul & Coote, 1999). Thus, pH and non-dissociated lactic content were considered separately.

Studying the effect of environmental factors on microbial growth with real products is too complex. This is the case with meat pieces, as shown in Bros *et al.* (2012), due to their uncontrolled physicochemical characteristics and endogenous flora and to the difficult formulation by varying a single characteristic at a time. Many studies use liquid culture media to study microbial growth and then extrapolate findings to the solid food. This leads to the “completeness error” described by Ross *et al.* (2000) as the model does not consider the effect of the solid matrix on the growth response (Wilson *et al.*, 2002). Consequently, several authors resort to solid model-foods to incorporate the matrix effect (Lebert *et al.*, 2004; Antwi *et al.*, 2007; Noriega *et al.*, 2009; Kapetanakou *et al.*, 2011). However, in the present case of *L. sakei* surface growth, the evolution of the surface, even in a solid model-food, is unknown due to the existence of diffusion phenomena and a lack of simple measurement techniques. Moreover, it would not be possible to isolate the effects of water activity and salt from those of pH and lactic acid modified by bacterial metabolism. An original experimental device was conceived for this study to characterize *L. sakei* in surface growth conditions where there was no end-product (lactic acid) accumulation. The growth response was characterized using predictive microbiology tools and comprised the determination of growth/no-growth boundaries and the behavior within the growth range. It was studied as a function of water activity, NaCl concentration, pH and non-dissociated lactic acid concentration.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strain and culture broth

The *L. sakei* strain DGCC5038 was kindly provided in freeze-dried form by Danisco (Danisco, Copenhagen, Denmark). A meat-mimicking broth was formulated using 10 g/l of meat extract (BBL™ Beef Extract Powder, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 5 g/l of yeast extract (Bacto™ Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company) and 5 g/l of D-glucose. After sterilization (15 min at 121 °C), the pH of the culture broth was adjusted with HCl (1 mol/l) to 5.60, the mean value for postmortem conversion of muscle to meat (Huff-Lonergan, 2010). This culture broth, very similar to that of Papathomopoulou & Kotzekidou (2009), was called MYG (Meat, Yeast, Glucose) broth.

2.2. Experimental device description

Figure 1a shows the original experimental device conceived for this research. It was composed of a glass body (capacity ≈ 100 ml) filled with MYG broth and an upper opening holding a polyethersulfone (PES) Express PLUS membrane of 47 mm of diameter, 0.45 μm of porosity and 8.6 cm^2 of effective surface (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

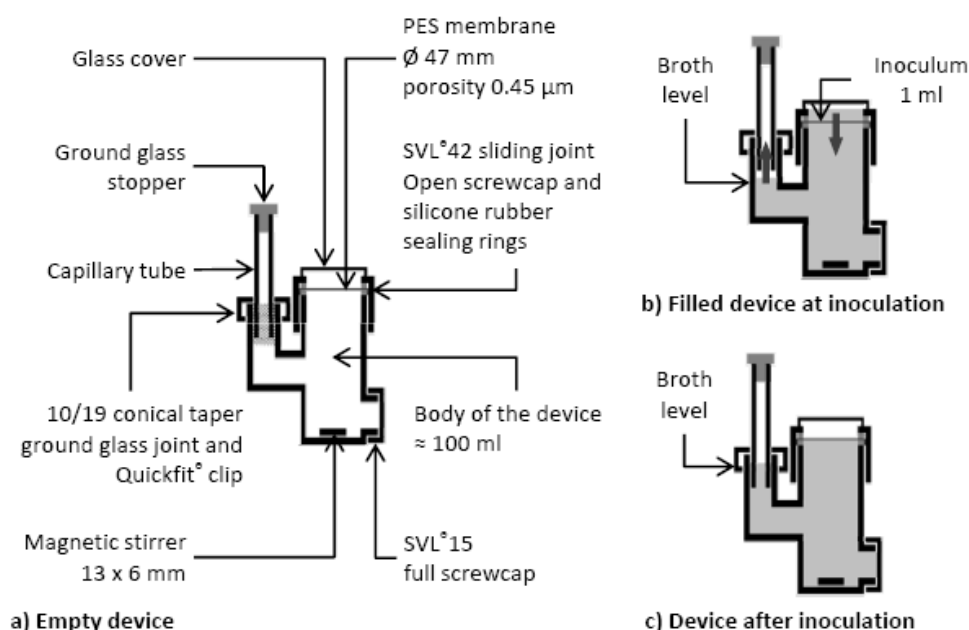


Figure 1. Experimental device, schematic representation of the empty device (a), device filled with culture broth at inoculation (b), filled device after inoculation (c).

During trials, the lower surface of the membrane was in permanent contact with the agitated MYG broth while inoculated *L. sakei* grew on the upper surface. At the beginning of trials, the device was filled with MYG broth through the capillary tube and was emptied through the lower opening at the end of trials. The device was properly dimensioned and easy to handle, and the limitation of growth was due to spatial restriction and not to end-product accumulation or substrate depletion (results not shown).

2.3. Experimental design

An experimental design (see left-side of Table 1) was constructed to study the effect of each of the four environmental factors, water activity (a_w), NaCl concentration ($[NaCl]$), pH and non-dissociated lactic acid concentration ($[LaH]$) on the surface growth of *L. sakei*. The reference trial, to which all trials were compared, was conducted in basic MYG broth without any additional ingredient. Its characteristics ($a_w = 1$, pH = 5.60, $[NaCl] = 0$, $[LaH] = 0$) were considered as the optimum conditions for *L. sakei* growth within the experimental design. Concerning pH, the behavior above the reference value of 5.60 was out of the scope of this study. Glycerol was used to modify a_w . NaCl was added to modify NaCl concentration. HCl (1 mol/l) was added to modify pH. Lactic acid 80 % (w/v) purity was added to increase $[LaH]$ at a fixed pH of 4.70 adjusted with NaOH (5 mol/l). At pH 4.70, the percentage of LaH was determined to be around 18 %. The lower limits of the growth range were determined in exploratory trials. They corresponded to the conditions for which *L. sakei* growth after 24 h was not higher than $1.0 \log_{10}$ CFU/cm², a value chosen in accordance with Koutsoumanis *et al.* (2004b).

2.4. Surface-growth trials

A pre-culture of *L. sakei* was prepared in MYG broth by adding 0.1 g/l of the freeze-dried bacteria. After 3 h incubation at 25 °C, the culture was diluted 100-fold according to OD_{600 nm} measurement to obtain an inoculation suspension at $5.0 \log_{10}$ CFU/ml. The devices filled with MYG broth were inoculated under sterile conditions by placing 1 ml of the inoculation suspension on the membrane (see Figure 1b), achieving an initial load of $4.2 \log_{10}$ CFU/cm². The

inoculation suspension seeped through the membrane leaving the bacterial cells on the surface (see Figure 1c). This was made possible by the difference in broth levels before inoculation between the body of the device and the capillary tube. Finally, the devices were placed on a Multistirrer-15 magnetic stirrer (VELP Scientifica, Usmate, Italy) and in a climatic chamber (Model CL, BIA, Conflans-Sainte-Honorine, France) at 25 °C for incubation.

2.5. Sampling method and analysis

For each sampling time one device was taken out of the chamber. The membrane and the MYG broth were removed under sterile conditions. The membrane was placed in a 50-ml centrifuge tube with glass beads and 10 ml of buffered peptone water. This tube was vortexed for 1 min to wash the cells off the membrane. The suspension thus obtained was enumerated for lactic-acid-bacteria by pour-plating appropriate dilutions in triplicate on de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) (Oxoid, Cambridge, UK) and reading after 48 h incubation at 30 °C. Water activity of MYG broth was measured at 25 °C using a fast-lab Water Activity Meter (GBX, Romans, France) with a precision of ± 0.003 and pH was measured using a TitroLine® easy titrator (SI Analytics GmbH, Mainz, Germany) with a precision of ± 0.05 .

2.6. Data analysis

2.6.1. Primary growth model. The primary growth model of Huang (2008) was used to describe the evolution of the number of cells per square centimeter (N) [CFU/cm²] as a function of time (t) [h].

$$\frac{dN}{Ndt} = \mu_{\max} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[-\alpha(t - \lambda)]} \right\} \left(1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \quad (1)$$

with initial conditions ($t = 0$) $N = N_0$ where N_0 [CFU/cm²] is the initial number of cells. In Equation (1) μ_{\max} [h⁻¹] is the maximum specific growth rate, α [-] a curvature parameter, λ [h] the duration of the lag phase and N_{\max} [CFU/cm²] the maximal number of cells. In stationary

conditions, Equation (1) is integrated to express y , the natural logarithm of N (Equations (2) and (3)):

$$y(t) = y_0 + y_{\max} - \ln\{\exp(y_0) + \exp[-\mu_{\max}B(t)] [\exp(y_{\max}) - \exp(y_0)]\} \quad (2)$$

$$\text{where} \quad B(t) = t + \frac{1}{\alpha} \ln \left\{ \frac{1 + \exp[-\alpha(t - \lambda)]}{1 + \exp(\alpha\lambda)} \right\} \quad (3)$$

In Equation (2), y_0 [-] is the natural logarithm of N_0 and y_{\max} [-] is the natural logarithm of N_{\max} .

Primary model parameters were iteratively adjusted to the goodness-of-fit merit-function using the the Nelder-Mead simplex method (Lagarias *et al.*, 1998) with the “*fminsearch*” function of Matlab® software version 6.5 (Matlab®, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). This merit-function was the mean squared error (MSE) between experimental (y) and simulated data (\hat{y}) (Equation (4)):

$$MSE = \frac{1}{n_t - n_p} \sum_{i=1}^{n_t} (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4)$$

where n_t is the number of data points and n_p the number of parameters. The model in Equations (2) and (3) contains five parameters: α , λ , μ_{\max} , y_0 , y_{\max} . A preliminary parameter estimation procedure was performed with reference trial data to find α and y_0 . They were then considered as constants in the other trials thus reducing n_p to three: λ , μ_{\max} , y_{\max} . After parameter estimation using $y = \ln N$, results were commented as N or $\log_{10} N$.

The root mean squared error (RMSE) between experimental and simulated data was chosen as a goodness-of-fit indicator for the estimated parameters. The confidence interval for each parameter was determined via Monte-Carlo simulations with 5000 simulations for each trial considering the experimental uncertainty of the plate-count method at 0.1 (Mossel *et al.*, 1995). The correlation between estimated parameters (λ , μ_{\max} , y_{\max}) was assessed using the “*corrcoef*” function of Matlab® software version 6.5 (Matlab®, The MathWorks Inc.).

2.6.2. *Effect of environmental factors.* The γ -concept (Zwietering *et al.*, 1996) was used as a basis to describe the effect of a_w , [NaCl], pH and [LaH] on μ_{\max} .

$$\mu_{\max} = \mu_{\max \text{ref}} \gamma_{\mu_{\max}}(a_w) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{NaCl}) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH}) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{LaH}) \quad (5)$$

In Equation (5), $\mu_{\max \text{ref}}$ is considered as the optimal maximum specific growth rate within our experimental design and $\gamma_{\mu_{\max}}(a_w)$, $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{NaCl})$, $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH})$ and $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{LaH})$ are the γ -functions for a_w , pH and the specific effects of NaCl and LaH.

Each trial in Table 1 gave one value of $\gamma_{\mu_{\max}} = \mu_{\max \text{trial}} / \mu_{\max \text{ref}}$ with the other γ -functions equal to 1. Thus, in Equation (5), $\gamma_{\mu_{\max}}(a_w)$ and $\gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH})$ were given by $a_{w \text{ gly}}$ and pH_{HCl} trials respectively. $\gamma_{\mu_{\max}}([\text{NaCl}])$ (Equation (6)) was given by NaCl trials and $\gamma_{\mu_{\max}}([\text{LaH}])$ (Equation (7)) by LaH trials.

$$\gamma_{\mu_{\max}}([\text{NaCl}]) = \gamma_{\mu_{\max}}(a_w) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{NaCl}) \quad (6)$$

$$\gamma_{\mu_{\max}}([\text{LaH}]) = \gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH}) \gamma_{\mu_{\max}}(\text{LaH}) \quad (7)$$

The specific effect of NaCl ($\gamma_{\mu_{\max}}(\text{NaCl})$) in Equation (5), was deduced using Equation (6) from the global salt effect ($\gamma_{\mu_{\max}}([\text{NaCl}])$) and the osmo-depressant effect ($\gamma_{\mu_{\max}}(a_w)$) at the corresponding a_w values. In the same manner, the specific effect of LaH ($\gamma_{\mu_{\max}}(\text{LaH})$) was deduced using Equation (7) from the global lactic acid effect ($\gamma_{\mu_{\max}}([\text{LaH}])$) and the pH-lowering effect ($\gamma_{\mu_{\max}}(\text{pH})$) at pH 4.70.

For each environmental factor, a_w , [NaCl], pH and [LaH], the $\gamma_{\mu_{\max}}$ function within the growth range was given by the best second-order function that verified $\gamma = 0$ when a_w , [NaCl], pH or [LaH] took the lower limit of the growth range values, and $\gamma = 1$ when a_w , [NaCl], pH or [LaH] took the reference values ($a_w = 1.00$, pH = 5.60, [NaCl] = 0 or [LaH] = 0).

In accordance with Lebert *et al.* (2007b) the γ -concept was extended to describe the dependence of λ to the environment (Equation (8)).

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{1}{\lambda_{\text{ref}}} \gamma_{\lambda}(a_w) \gamma_{\lambda}(\text{NaCl}) \gamma_{\lambda}(\text{pH}) \gamma_{\lambda}(\text{LaH}) \quad (8)$$

3. Results and Discussion

3.1. Determination of the lower limits of the growth-range

For a_w , no growth was observed at 0.90 or 0.93 and a slight growth above $1.0 \log_{10}$ CFU/cm² after 24 h was observed at 0.95. Thus, the growth limit was set at $a_w = 0.94$. For [NaCl], knowledge from $a_{w \text{ gly}}$ trials was used. These trials showed an impaired growth for $a_w = 0.96$, which we determined could be achieved with [NaCl] = 7 % (w/v) in MYG. Thus, NaCl trials were conducted at 6 % (w/v) and 7 % (w/v) and since growth above $1.0 \log_{10}$ CFU/cm² after 24 h was only observed for 6 % (w/v), the limit was set at [NaCl] = 7 % (w/v). Concerning pH, no growth was observed at 3.90 or 4.00 and a slight growth above $1.0 \log_{10}$ CFU/cm² after 24 h was observed at 4.10. The growth limit was set at pH = 4.00. Finally, concerning [LaH], no growth was observed at 0.5 % (w/v) while growth above $1.0 \log_{10}$ CFU/cm² after 24 h was observed at 0.3 % (w/v) so the limit was set at [LaH] = 0.5 % (w/v).

Thus the following growth ranges were established: $a_w = 1.00\text{-}0.94$, [NaCl] = 0-7 % (w/v), pH = 5.60-4.00 and [LaH] = 0-0.5 % (w/v).

The a_w 0.94 limit was in accordance with Leroy & De Vuyst (1999a) who found that a glycerol concentration of 21.1 % (w/v), which we determined corresponded to $a_w = 0.95$, led to an impaired growth of *L. sakei* with $\mu_{\max} = 0.18 \text{ h}^{-1}$ in MRS broth. The [NaCl] = 7 % (w/v) limit was consistent with Ammor *et al.* (2005) who found that all 36 *L. sakei* isolates from traditional dry sausages grew on MRS agar with an NaCl content of 4 % (w/w) but only 20 grew at an NaCl content of 6.5 % (w/w). The pH 4.00 limit was in agreement with Ammor *et al.* (2005) who found that all 36 *L. sakei* isolates grew on MRS agar at pH 4.20 but only four were able to grow at pH 3.90. The [LaH] = 0.5 % (w/v) limit corresponded to a total lactic acid concentration of 2.8 % (w/v) at pH 4.70 where the percentage of LaH was determined to be around 18 % (§2.3.). While being in the same order of magnitude, this value is higher than the limit given by Leroy & De Vuyst (1999a) which is approximately 1.7 % (w/v) in MRS broth at pH 5.50 and 25 °C. This difference may be strain-related or due to different growth conditions: on a surface supplied

with MYG broth at pH 4.70 in this study, vs. in MRS broth at pH 5.50 in Leroy & De Vuyst (1999a).

Finally, it is important to underline that within the growth ranges defined here, the decline phase of the growth curve was never observed within 48 h, the cells remained in a stationary phase induced by the unfavorable environmental conditions.

3.2. Primary model performance

Figure 2 shows the evolution of the *L. sakei* population on the surface of the membrane for the reference trial during 24 h incubation at 25 °C. This growth curve shows an induction of the stationary phase around 9-10 h. The five primary model parameters (α , λ , μ_{\max} , y_0 , y_{\max}) were identified using 0-14 h data points (see “O” markers in Figure 2). Subsequent data points (see “□” markers in Figure 2) seemed to show a second growth phase and were not considered in further discussion.

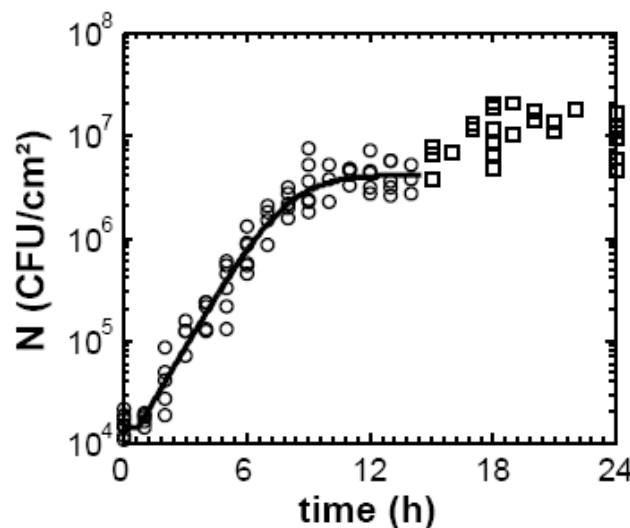


Figure 2. *Lactobacillus sakei* population (N) on membrane surface at 25 °C during the reference trial (MYG broth with $a_w = 1.00$, pH = 5.60, [NaCl] = 0, [LaH] = 0). Experimental data used in model construction (O), experimental data not explained by the model (□) and simulated growth curve using the primary model of Huang (2008) (—).

The preliminary estimation procedure detailed in §2.6.1. rendered $\alpha = 61$ and $y_0 = 9.55$ ($N_0 = 4.2 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$). Huang (2008) suggested $\alpha = 25$ to provide a transition from lag to exponential phase more abrupt than the too-smooth one given by the Baranyi & Roberts (1994)

III. RÉSULTATS

model. In this study, the value of α was increased to 61 for a more abrupt transition which compensates the lack of experimental data around the transition.

Table 1. Estimated parameters of the primary model of Huang (2008) for *Lactobacillus sakei* growth on membrane surface at 25 °C with different MYG broth characteristics (a_w , pH, [NaCl] and [LaH]). In the model, $\alpha = 61$ and $y_0 = 9.55$.

Trial	a_w	pH	[NaCl] (% (w/v))	[LaH]	λ (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	N_{\max} (log ₁₀ CFU/cm ²)	RMSE*
Reference	1.00	5.60	0	0	0.69 ± 0.08	0.79 ± 0.02	6.61 ± 0.02	0.17
$a_{w \text{ gly}} 0.98$	0.98	5.60	0	0	0.38 ± 0.23	0.52 ± 0.02	6.64 ± 0.03	0.15
$a_{w \text{ gly}} 0.96$	0.96	5.60	0	0	7.35 ± 0.55	0.33 ± 0.02	6.34 ± 0.05	0.08
NaCl 4	0.98	5.60	4	0	2.38 ± 0.39	0.38 ± 0.02	6.52 ± 0.04	0.17
NaCl 6	0.97	5.60	6	0	10.27 ± 0.52	0.25 ± 0.01	6.03 ± 0.06	0.10
pH _{HCl} 4.70	1.00	4.70	0	0	0.58 ± 0.36	0.43 ± 0.02	6.49 ± 0.03	0.16
pH _{HCl} 4.10	1.00	4.10	0	0	5.50 ± 0.54	0.20 ± 0.05	5.32 ± 0.73	0.08
LaH 0.3	1.00	4.70	0	0.3	5.58 ± 0.41	0.41 ± 0.04	5.55 ± 0.05	0.08

Values for the estimated kinetic parameters are presented as the mean value ± 95 % confidence interval determined with Monte-Carlo simulations: 5000 sets of random N(t) data with 10 % uncertainty.

*RMSE: root mean squared error between experimental and predicted data.

After identifying the values for α and y_0 , the other model parameters (λ , μ_{\max} , y_{\max}) were estimated for all trials and the results appear in the right-hand side of Table 1. For all trials and all parameters, the estimation procedure rendered normal distributions for λ , μ_{\max} and y_{\max} . RMSE values (0.12 in average for all trials) were close to the experimental uncertainty of 0.10 for the plate-count method and proved the goodness-of-fit of the model (Ratkowsky, 2003).

However, the correlation coefficients “ $\Delta\lambda$ vs. $\Delta\mu_{\max}$ ” (data not shown) were high (0.83 in average for all trials) suggesting that the experimental dataset was insufficient to accurately describe the transition from lag to exponential phase. This difficulty in predicting λ has been observed by several authors who have sought different modelling approaches in relation with different underlying biological explanations of the lag phase (Baty & Delignette-Muller, 2004; Francois *et al.*, 2005; Muñoz-Cuevas *et al.*, 2010). The model of Huang (2008) still satisfactorily described the experimental data as shown by the evenly-distributed residues ($y - \hat{y}$) (see Figure 3).

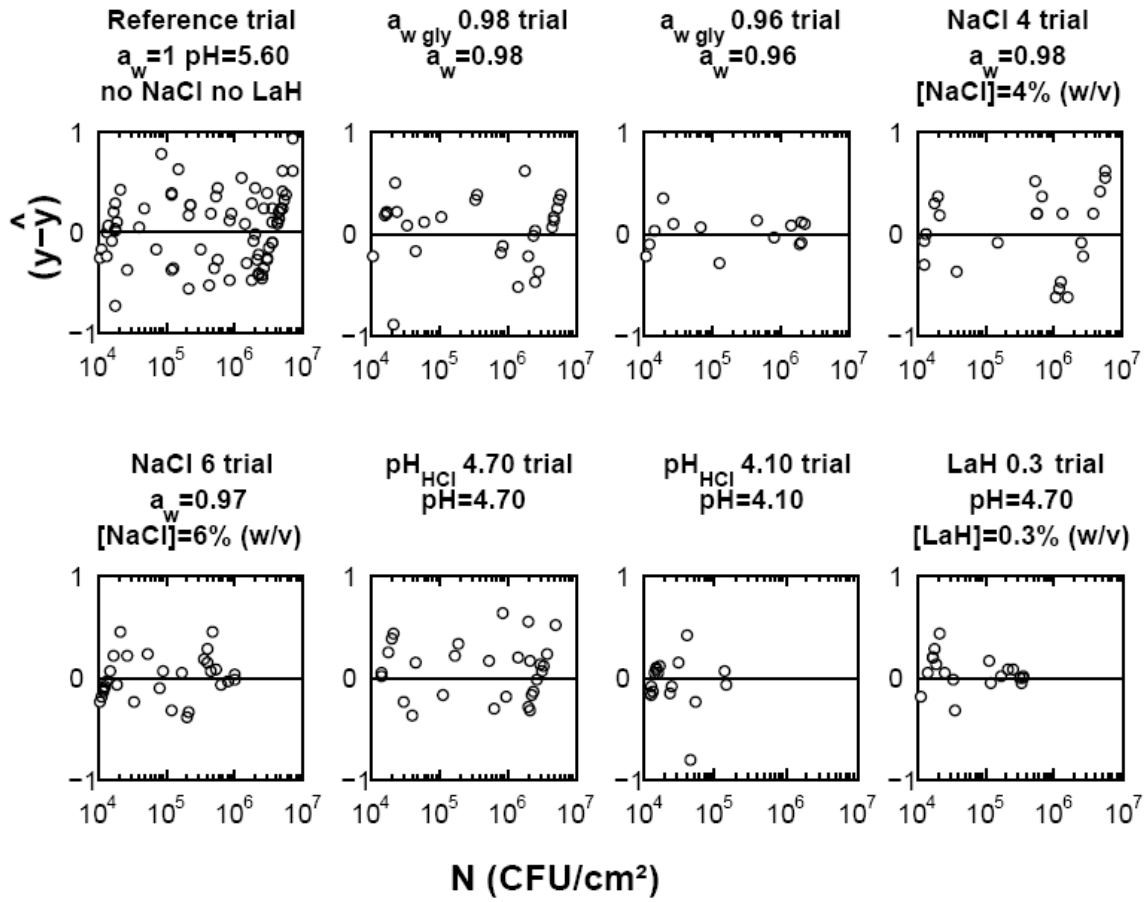


Figure 3. Residues plots ($y - \hat{y}$) for primary model performance assessment.

3.3. γ -functions

The proportional relationship between λ and μ_{\max} shown by Baranyi & Roberts (1994) was not verified in this study. Thus, as it was not possible to deduce λ from μ_{\max} , it was necessary to use independent γ -functions to describe the effect of environmental factors on λ . The γ -concept could be effectively applied to λ because by using the same pre-culture conditions for all trials, the history of the cells prior to inoculation was identical and so λ only depended on the environmental factors encountered upon inoculation on the devices. Figure 4 shows the γ -functions both for λ and μ_{\max} obtained for all trials in Table 1.

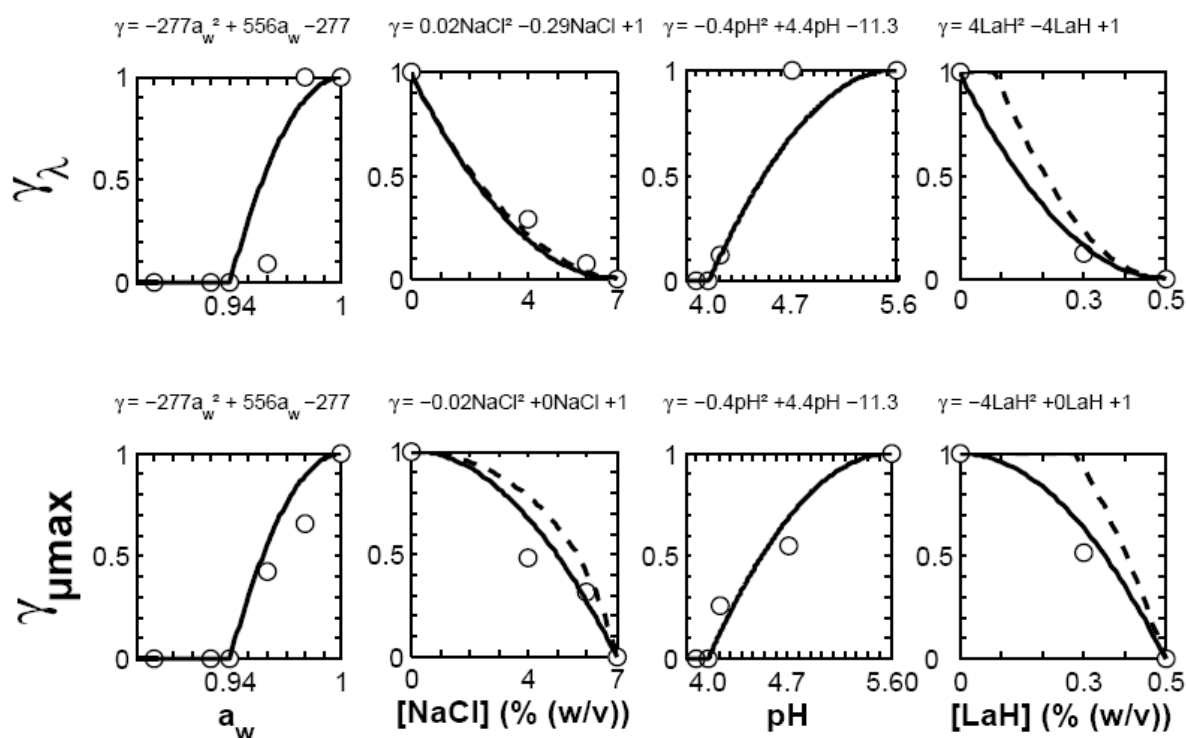


Figure 4. Explanatory γ -functions of the influence of a_w , [NaCl], pH and [LaH] on growth of *Lactobacillus sakei* on membrane surface at 25 °C. γ_λ and $\gamma_{\mu_{\max}}$ are the functions relative to λ and μ_{\max} respectively. Experimental γ -points (O), γ -functions and corresponding second-degree equations (—) and for [NaCl] and [LaH], specific effect of each molecule (- -).

The use of the γ -concept relies on the hypothesis that the reference trial (MYG broth with $a_w = 1.00$, pH = 5.60, [NaCl] = 0, [LaH] = 0) represented the optimum conditions for the growth of *L. sakei*. However, Leroy & De Vuyst (1999b) observed that the optimum pH for *L. sakei* growth was between 6.00 and 6.50, Korkeala *et al.* (1992) showed that the presence of 1-2 % (w/v) NaCl could improve growth of lactic-acid-bacteria. Nevertheless, this first outline of the effect of environmental factors can be used as a starting point to produce more γ -points at relevant values to perfect the initial relation.

3.4. Dual effect of NaCl and LaH

The γ -concept was extended to show the dual effect of NaCl and LaH (§2.6.2.). The γ -functions for the global effects ($\gamma([\text{NaCl}])$ and $\gamma([\text{LaH}])$) and for $\gamma(a_w)$ and $\gamma(\text{pH})$ were calculated using the second-degree equations in Figure 4. The specific effects ($\gamma(\text{NaCl})$ and $\gamma(\text{LaH})$) (Table 2), were

deduced using Equations (6) and (7) and appear as dashed lines in Figure 4. Growth curves in Figure 5 also show the dual effect on λ and μ_{\max} of NaCl and LaH.

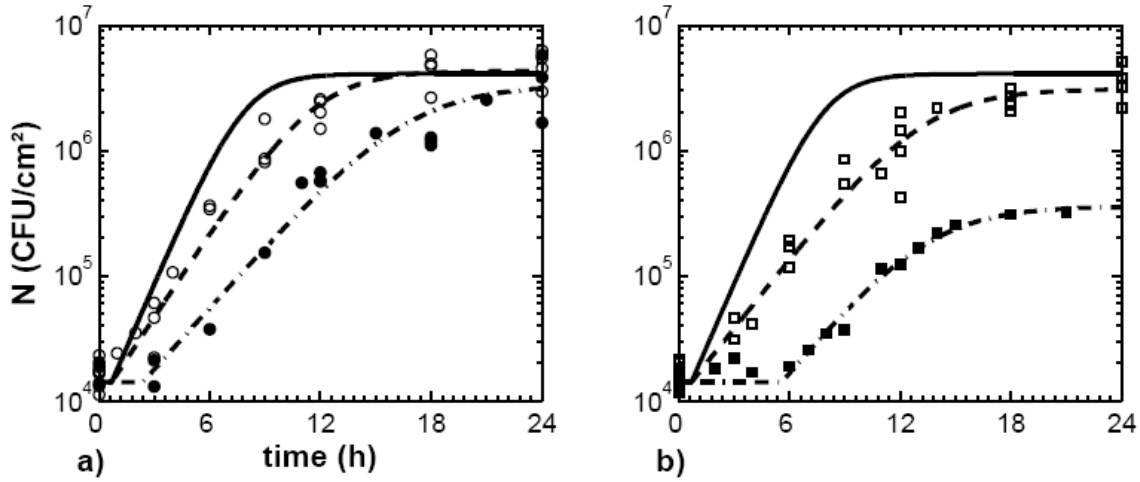


Figure 5. *Lactobacillus sakei* growth curves showing the effects of NaCl and LaH. Reference trial: MYG broth with $a_w = 1.00$, pH = 5.60, [NaCl] = 0, [LaH] = 0 (—), $a_{w \text{ gly}} 0.98$ trial: $a_w = 0.98$ (O - -) and NaCl 4 trial: $a_w = 0.98$ [NaCl] = 4 % (w/v) (● -.-) (a). Reference trial (—), pH 4.70 trial: pH = 4.70 (□ - -) and LaH 0.3 trial: pH = 4.70 [LaH] = 0.3 % (w/v) (■ -.-) (b).

Concerning λ , the tendency was the same for NaCl and LaH. It appeared that the specific effect was dominating ($\gamma\lambda(\text{NaCl}) = 0.21$ and $\gamma\lambda(\text{LaH}) = 0.23$) and neither an a_w of 0.98 nor a pH of 4.70 appeared to have a great effect on λ ($\gamma\lambda(a_w) = 0.89$ and $\gamma\lambda(\text{pH}) = 0.68$). The conditions in the trials NaCl 4 ($a_w = 0.98$ [NaCl] = 4 % (w/v)) and LaH 0.3 (pH = 4.70 [LaH] = 0.3 % (w/v)) both induced a distinct lag phase: 2.38 h in the NaCl 4 trial and 5.58 h in the LaH 0.3 trial.

Concerning μ_{\max} , the behavior was different for NaCl and LaH. For NaCl, it appeared that the osmo-depressant effect ($\gamma\mu_{\max}(a_w) = 0.89$) was equivalent to the specific effect ($\gamma\mu_{\max}(\text{NaCl}) = 0.76$). This was apparent in Figure 5a by the gradual decrease of μ_{\max} from the reference trial ($\mu_{\max} = 0.79 \text{ h}^{-1}$) to the $a_{w \text{ gly}} 0.98$ trial ($\mu_{\max} = 0.52 \text{ h}^{-1}$) to the NaCl 4 trial ($\mu_{\max} = 0.38 \text{ h}^{-1}$). As for LaH, the dominating effect on μ_{\max} was the pH-lowering effect ($\gamma\mu_{\max}(\text{pH}) = 0.68$) and the specific effect ($\gamma\mu_{\max}(\text{LaH}) = 0.94$) was not very pronounced. This appears in Figure 5b as the exponential phases of the pH 4.70 trial ($\mu_{\max} = 0.43 \text{ h}^{-1}$) and the LaH 0.3 trial ($\mu_{\max} = 0.41 \text{ h}^{-1}$) were almost parallel.

Table 2. γ -values showing the effects of NaCl and LaH.

	Global effect	Dual effect	
	$\gamma([\text{NaCl}])$	$\gamma(a_w)$	$\gamma(\text{NaCl})$
Trial	NaCl 4	$a_{w \text{ gly}}$ 0.98	
γ_λ	0.18	0.89	0.21
$\gamma_{\mu\max}$	0.67	0.89	0.78
	$\gamma([\text{LaH}])$	$\gamma(\text{pH})$	$\gamma(\text{LaH})$
Trial	LaH 0.3	pH_{HCl} 4.70	
γ_λ	0.16	0.68	0.23
$\gamma_{\mu\max}$	0.64	0.68	0.94

$\gamma([\text{NaCl}])$ is the product of $\gamma(a_w)$ by the specific $\gamma(\text{NaCl})$ and $\gamma([\text{LaH}])$ is the product of $\gamma(\text{pH})$ by the specific $\gamma(\text{LaH})$.

Leroy & De Vuyst (1999a) found that a glycerol concentration of 21.1 % (w/v) ($a_w = 0.95$) had the same effect as an NaCl concentration of 6.5 % (w/v) which we determined corresponded to $a_w = 0.96$. This confirmed our findings that NaCl had a more pronounced effect on cell growth than the addition of glycerol. Theys *et al.* (2010) also showed an additional effect of NaCl aside from the osmo-depressant quality of the molecule concluding that it is best to consider the concentration of the solute rather than the single a_w as the osmo-depressant effect can vary with the solute (NaCl, glycerol, sugar, etc.). Zhou *et al.* (2011) explained for *Salmonella enterica* that the osmotic stress response depended on the capacity of cells to synthesize osmo-protectants and take them up from the environment, but also on the presence (or not) of osmo-protectants in the environment. Osmo-protectants such as amino-acids and trehalose are naturally-occurring in yeast extract, one of the compounds of the MYG broth. Therefore, the osmotic stress response in DIS-treated meat could be less favorable than in MYG broth depending on whether osmo-protectants are present in the meat or not.

Concerning LaH, the choice of non-dissociated lactic acid concentration rather than the total lactic acid concentration as a relevant environmental factor was shown to be advisable as the percentage of LaH depends not only on the pH but also on medium-specific characteristics such as the buffering capacity (Vereecken & Van Impe, 2002).

3.5. Discussion on the coupling of DIS and fermentation

In prior research into the coupling of DIS and surface lactic fermentation for the treatment of meat pieces (Bros *et al.*, 2012), meat was allowed to rest for 18 h at 4 °C between the DIS and fermentation steps to allow water, salt and sugar to equilibrate within the pieces and avoid too low a_w or too high salt content on the surface. After the DIS treatment (and the equilibration period) suggested for the successful coupling with fermentation, the meat pieces had the following characteristics: an a_w of 0.98, an NaCl content of 2.7 % (w/w), a pH of 5.34 and a negligible LaH content given the pH. In this case, the model predicts *L. sakei* growth on the surface with $\lambda = 2.00$ h and $\mu_{\max} = 0.61$ h⁻¹. Solignat (1999) gives the following end-product characteristics for dry fermented sausages: pH 4.80 and a total lactic acid content around 1.4 % (w/w). According to this, meat pieces would have the following characteristics after fermentation: an a_w of 0.98, an NaCl content of 2.7 % (w/w), a pH of 4.80 and a LaH content of 0.2 % (w/w). The model then predicts a decrease of μ_{\max} to 0.40 h⁻¹ signaling the end of the fermentation step.

Moreover, the necessity of equilibration before inoculation can be questioned. Immediately after the DIS treatment suggested in the previous study, the characteristics of the meat surface would be, at worst, those of the immersion solution which were subsequently investigated to be $a_w = 0.93$ and $[\text{NaCl}] = 5.5$ % (w/v). The model predicts that growth would not occur until a_w equilibrates within the product thus becoming higher than 0.94 (the determined growth limit) at the surface. Nevertheless, inoculation immediately after the DIS treatment is still advisable as the presence of high levels of *L. sakei*, effectively competitive in a meat environment (Chaillou *et al.*, 2005) create an additional protection hurdle against pathogens and spoilage microbiota. Once the conditions on the surface allow it, the growth of *L. sakei* would resume creating new protection hurdles: colonization of the surface and mobilization of nutritional resources, acidification by lactic acid production, and synthesis of other antimicrobial compounds (bacteriocins).

4. Conclusion

For each of the four environmental factors, water activity, NaCl concentration, pH and non-dissociated lactic acid concentration, growth/no-growth boundaries were determined. The primary growth model of Huang (2008) and the γ -concept applied to the duration of the lag phase and to the maximum specific growth rate, gave guidelines on the effect of the environmental factors on the surface growth of *L. sakei* and dual effects of salt and lactic acid were demonstrated. Concerning salt an additional specific effect was apparent aside from its osmo-depressant quality. Concerning lactic acid, the pH-lowering effect and the toxicity of the non-dissociated form were described.

The model will be used in further research to predict growth in non-stationary conditions. The end-goal is to assess the performance of *L. sakei* inoculated on DIS-treated meat pieces and to optimize the DIS operation in order to favor the development of *L. sakei*. The model should predict the response of *L. sakei* to changes in a_w , salt, pH and lactic acid occurring on the surface of the meat pieces throughout the process.

Finally, it is noteworthy that the original device conceived for this research has potential to study other surface growth situations by changing the microorganism and/or the formulation of the culture medium.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conseil Régional de la Réunion who provided financial support for this study.

References

- Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., Chevallier, I. 2005. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology* 22, 529-538.
- Antwi, M., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., Geeraerd, A.H. 2007. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. *International Journal of Food Microbiology* 120, 71-84.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baty, F., Delignette-Muller, M.-L. 2004. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology* 91, 261-277.
- Bros, M., Arnaud, E., Loiseau, G., Talon, R., Collignan, A. 2012. Feasibility of Coupling Dehydration-Impregnation by Soaking Treatment of Meat with Fermentation by *Lactobacillus sakei*. *Journal of Food Science* 77, M434-M440.
- Brul, S., Coote, P. 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 1-17.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Martin, V., Beaufils, S., Darbon-Rongere, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M. 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology* 23, 1527-1533.
- Collignan, A., Raoult-Wack, A.-L. 1994. Dewatering and salting of cod by immersion in concentrated sugar/salt solutions. *LWT - Food Science and Technology* 27, 259-264.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M. 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 100, 41-53.
- Huang, L. 2008. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters - Determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions. *Journal of Food Science* 73, E235-E242.
- Huff-Lonergan, E.J. 2010. Chemistry and Biochemistry of Meat. In: Toldrá, F., (Ed.), *Handbook of Meat Processing*. Wiley-Blackwell, Ames. 5-24.
- Hüfner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq, A.-M., Zagorec, M., Hertel, C. 2007. Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2522-2531.
- Kapetanakou, A.E., Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N. 2011. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in vitro and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food Microbiology* 28, 727-735.
- Korkeala, H., Alanko, T., Tiusanen, T. 1992. Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica* 33, 27-32.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N. 2004. Modeling the Boundaries of Growth of *Salmonella Typhimurium* in Broth as a Function of Temperature, Water Activity, and pH. *Journal of Food Protection* 67, 53-59.
- Lagarias, J.C., Reeds, J.A., Wright, M.H., Wright, P.E. 1998. Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. *Siam Journal on Optimization* 9, 112-147.

- Lebert, I., Dussap, C.G., Lebert, A. 2004. Effect of a_w , controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology* 94, 67-78.
- Lebert, I., Nicolas, C., Portanguen, S., Lebert, A. 2007. Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process. *Journal of Food Engineering* 78, 1371-1381.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 1999a. The Presence of Salt and a Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5350-5356.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 1999b. Temperature and pH Conditions That Prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocin Sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 974-981.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285.
- Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., Baird, R.M. 1995. *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Muñoz-Cuevas, M., Fernández, P.S., George, S.M., Pin, C. 2010. Modeling the Lag Period and Exponential Growth of *Listeria monocytogenes* under Conditions of Fluctuating Temperature and Water Activity Values. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2908-2915.
- Neysens, P., Messens, W., De Vuyst, L. 2003. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology* 88, 29-39.
- Noriega, E., Laca, A., Díaz, M. 2009. *Listeria* growth under diffusional limitations in synthetic meats. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 725-734.
- Papathomopoulou, K., Kotzekidou, P. 2009. Inactivation of verocytotoxigenic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* co-cultured with *Lactobacillus sakei* in a simulated meat fermentation medium. *Journal of Food Safety* 29, 331-347.
- Ratkowsky, D.A. 2003. Model fitting and uncertainty. In: McKellar, R.C., Lu, X., (Eds.), *Modelling microbial responses in food*. CRC Press, Washington D. C. 151-196.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231-245.
- Santchurn, S.J., Collignan, A., Trystram, G. 2007. Impact of solute molecular mass and molality, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution. *Journal of Food Engineering* 78, 1188-1201.
- Solignat, G. 1999. Séchage - Maturation. In: Durand, P., (Ed.), *Technologies des produits de charcuterie et des salaisons*. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 279-391.
- Tempest, D.W., Meers, J.L. 1968. The influence of NaCl concentration of the medium on the potassium content of *Aerobacter aerogenes* and on the inter-relationships between potassium, magnesium and ribonucleic acid in the growing bacteria. *Journal of General Microbiology* 54, 319-325.
- Theys, T.E., Geeraerd, A.H., Devlieghere, F., Van Impe, J.F. 2010. On the selection of relevant environmental factors to predict microbial dynamics in solidified media. *Food Microbiology* 27, 220-228.
- Vereecken, K.M., Van Impe, J.F. 2002. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 73, 239-250.

- Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T., Van Impe, J.F. 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73, 275-289.
- Zhou, K., George, S.M., Metris, A., Li, P.L., Baranyi, J. 2011. Lag Phase of *Salmonella enterica* under Osmotic Stress Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1758-1762.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Notermans, S. 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.

III.2.3. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

III.2.3.1. RÉSULTATS DÉVELOPPÉS DANS L'ARTICLE

En utilisant le modèle primaire de Huang (2008) et le γ -concept, les données d'une campagne d'essais de croissance en surface de *L. sakei* sur un dispositif expérimental original ont été interprétées pour mettre en évidence l'effet de l'activité en eau (a_w), la concentration en sel ([NaCl]), le pH et la concentration en acide lactique non-dissocié ([LaH]). Les limites de croissance en fonction de chaque facteur ont été déterminées ($a_w = 0,94$, [NaCl] = 7 % (p/v), pH = 4,00 et [LaH] = 0,5 % (p/v)) et l'effet de chaque facteur sur l'ensemble de l'intervalle de croissance a été mis en évidence à la fois sur la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) et sur la durée de la phase de latence (λ). Enfin, les effets toxiques spécifiques du sel et de la forme non-dissociée de l'acide lactique ont été montrés.

III.2.3.2. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

L'approche modulaire utilisée pour décrire les effets des facteurs étudiés a mené à la construction d'un plan d'expériences (Tableau 7) dans lequel chaque facteur varie un à un (dans la mesure du possible, voir la section IV.3.3.1). L'effet de chaque facteur environnemental est décrit par une fonction- γ adimensionnelle comprise entre 0 et 1 et l'effet d'une combinaison de facteurs s'obtient en multipliant les fonctions- γ respectives de chaque facteur.

Tableau 7. Plan d'expériences pour l'étude en milieu modèle de l'influence de l'activité en eau, du sel, du pH et de l'acide lactique non-dissocié sur la croissance en surface de *Lactobacillus sakei*.

Essais	Facteur environnemental	Valeur limite	Valeurs intermédiaires			Valeurs de l'essai de référence
$a_{w \text{ gly}}$	a_w	0,94	0,96	0,98		1,00
NaCl	[NaCl] (% (p/v))	7	6	4		0
pH _{HCl}	pH	4,00	4,10	4,70		5,60
LaH	[LaH] (% (p/v))	0,5	0,3	–		0

Dans la littérature, les fonctions- γ sont construites en utilisant des modèles de type racine carrée (SR_n) ou cardinaux (CM_n) (Équations (23) à (25) Section I.3.3.2). Pour l'activité en eau, le modèle le plus utilisé est le modèle cardinal en prenant le paramètre de forme $n = 2$ (CM₂) (Augustin &

Carlier, 2000) mais on trouve aussi le modèle racine carrée en prenant le paramètre de forme $n = 1$ (SR₁) (Schvartzman *et al.*, 2011). Pour le pH, le modèle cardinal en prenant le paramètre de forme $n = 1$ (CM₁) (Augustin & Carlier, 2000) est utilisé en accord avec la forme parabolique que prend l'effet du pH. Le sel et l'acide lactique étant des substances inhibitrices, les modèles sont sous la forme SR₂ (Augustin & Carlier, 2000), ou IS₁ (Schvartzman *et al.*, 2011). La Figure 17 montre, pour les fonctions- γ relatives à λ et à μ_{\max} , la forme polynomiale de degré 2 choisie dans l'article (traits gras), ainsi que les autres formes qu'elles peuvent prendre en utilisant les modèles de type racine carrée ou cardinaux. Le Tableau 8 donne les valeurs cardinales utilisées pour chaque modèle.

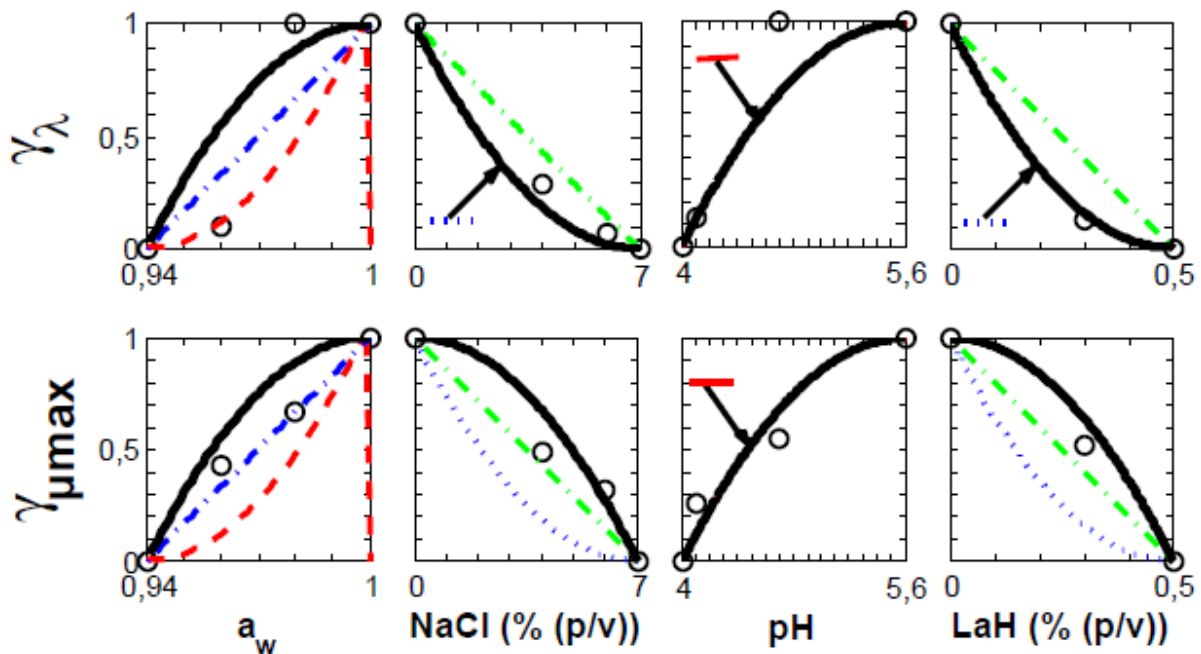


Figure 17. Formes des fonctions- γ relatives aux paramètres du modèle primaire : la durée de la phase de latence (λ) et la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}). Points expérimentaux (\circ), forme polynomiale de degré 2 choisie dans l'article (trait gras noir), modèle cardinal avec $n = 1$ (CM₁ trait plein rouge), modèle cardinal avec $n = 2$ (CM₂ tirets rouges), modèle racine carrée avec $n = 1$ (SR₁ trait point bleu), modèle racine carrée avec $n = 2$ (SR₂ pointillés bleus), modèle substance inhibitrice avec $n = 1$ (IS₁ trait point vert).

Le choix de ne pas déduire λ à partir de μ_{\max} mais de construire un modèle indépendant pour décrire l'influence des facteurs environnementaux sur λ est discuté dans §3.3. « γ -functions » des résultats et discussion de l'article, et plus en détail dans la section IV.3.2.3.

En ce qui concerne les fonctions $\gamma_{\mu\max}$, les modèles suggérés dans la littérature décrivent bien les points expérimentaux. Il s'agit pour l'activité en eau, d'un modèle de type SR₁, pour le sel et l'acide lactique de modèles de type IS₁ et pour le pH d'un modèle de type CM₁.

En ce qui concerne les fonctions γ_{λ} , pour le sel et l'acide lactique, le modèle SR₂ suggéré dans la littérature est confondu avec le polynôme utilisé dans l'article. Il en est de même pour le pH pour lequel le modèle CM₁ suggéré dans la littérature est confondu avec le polynôme. Cependant, dans le cas de l'activité en eau et du pH, la prédiction, que ce soit avec le polynôme utilisé dans l'article ou avec les modèles de la littérature, reste problématique. En effet, les valeurs de γ issues des essais $a_w = 0,98$ et $\text{pH} = 4,7$ sont égales à 1 car, comme le montre le Tableau 1 de l'article, les valeurs de λ dans ces essais ne sont pas significativement différentes de la valeur λ de référence. La prédiction serait améliorée en concevant un nouveau modèle qui contemple l'existence, non pas d'une seule valeur optimale, mais plutôt d'un « intervalle optimal » dans lequel la variation du facteur n'a pas d'effet sur λ .

Tableau 8. Formes et valeurs cardinales utilisées pour les fonctions- γ présentées dans la Figure 17.

Facteur (X_i)	Modèles	X_{\min}^*	X_{opt}	X_{\max}
a_w	CM ₂	0,94	$1-\varepsilon^{**}$	1,00
	SR ₁	0,94	1,00	-
[NaCl]	IS ₁	7	0	-
	SR ₂	7	0	-
pH	CM ₁	4,00	5,60	$2X_{\text{opt}}-X_{\min}=7,2$
[LaH]	IS ₁	0,5	0	-
	SR ₂	0,5	0	-

* appelé MIC pour [NaCl] et [LaH].

** $\varepsilon=0,001$

L'effort expérimental de cette partie était centré sur la recherche des limites de croissance pour chaque facteur environnemental. En conséquence, les valeurs optimales (X_{opt}) ont été prises empiriquement égales aux valeurs de l'essai de référence : $a_w = 1,00$ [NaCl] = 0 pH = 5,60 [LaH] = 0 (Tableau 7). De plus, l'objectif de cette partie était de construire un modèle descriptif plutôt qu'explicatif pour prédire la croissance de *L. sakei* à la surface d'une viande pré-traitée par DII. Il nous a donc semblé plus pertinent et plus simple, pour traduire les évolutions des

fonctions γ_λ et $\gamma_{\mu\max}$ dans un objectif descriptif, d'utiliser des polynômes de degré 2 qui représentent mieux l'ensemble des points- γ expérimentaux. La génération d'autres points expérimentaux permettrait de déterminer plus précisément les valeurs optimales de croissance et d'affiner les modèles retenus.

III.2.3.3. CONCLUSION

L'étude en milieu modèle a permis la construction d'un modèle descriptif de croissance de *L. sakei* sur une surface, en fonction de l'activité en eau, du sel, du pH et de l'acide lactique non-dissocié. Dans la suite de l'étude ce modèle sera incorporé dans un modèle global simulant le comportement de la surface d'une viande traitée par DII puis inoculée par *L. sakei*. Ce modèle incorporera l'évolution de la population bactérienne dans le cadre du changement de la composition de la surface du fait des transferts de matière au cours et après le traitement de DII.

III.3. MODÉLISATION DE LA CROISSANCE DE *LACTOBACILLUS SAKEI* À LA SURFACE D'UNE VIANDE APRÈS DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION

III.3.1. INTRODUCTION

La croissance de *L. sakei* en surface d'une viande traitée par DII est simulée à l'aide d'un modèle global. Celui-ci incorpore le modèle de croissance de *L. sakei* mis au point sur dispositif expérimental (Section III.2) et un modèle de transfert de matière. Ce dernier simule la variation de l'activité en eau et de la teneur en sel au sein des morceaux de viande au cours et après le traitement de DII. Pendant la DII, la viande s'appauvrit en eau et s'enrichit en solutés puis, une fois la viande sortie de la solution d'immersion, l'eau et les solutés s'équilibrent entre la surface et le cœur. Le modèle global est utilisé dans l'article ci-après pour évaluer l'aptitude de différents traitements de DII à permettre la croissance de *L. sakei*. Le but est de savoir quelles sont les meilleures conditions de DII et quel est le meilleur moment pour inoculer la surface de la viande avec *L. sakei*. La croissance de *L. sakei* à la surface d'une viande traitée par DII est également comparée à la croissance de flores pathogènes (*Salmonella* et *Escherichia coli*) en utilisant pour ces dernières le logiciel Sym'Previus pour connaître leur vitesse spécifique de croissance maximale dans ces conditions.

III.3.2. TEXTE DE LA PUBLICATION : INTEGRATED MODEL FOR MASS TRANSFERS AND LACTOBACILLUS SAKEI GROWTH ON THE SURFACE OF MEAT AFTER DEHYDRATION-IMPREGNATION BY SOAKING TREATMENTS (EN PRÉPARATION)

Integrated model for mass transfers and *Lactobacillus sakei* growth on the surface of meat after Dehydration-Impregnation by Soaking treatments

Manuela Bros ^{a,b}, Philippe Bohuon ^c, Elodie Arnaud ^{d*}, Gérard Loiseau ^c, Antoine Collignan ^c

^a Université de Montpellier 2 Sciences et Techniques – UMR Qualisud, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^b CIRAD – UMR Qualisud, 73 rue Jean-François Breton, 34098 Cedex 5 Montpellier, France

^c Montpellier SupAgro – UMR Qualisud, Institut des Régions Chaudes, 1101 avenue Agropolis, BP 5098, 34093 Montpellier Cedex 5, France

^d CIRAD – UMR Qualisud, Pôle qualité des productions agricoles et alimentaires, BP 20, 97408 Saint-Denis Messagerie Cedex 9, Réunion, France

Abstract

In the production of salted-dried-fermented meat pieces by an innovative treatment combining Dehydration-Impregnation by Soaking (DIS) and a subsequent surface fermentation by *Lactobacillus sakei*, the challenge is to formulate the meat by DIS in a way that will favor a rapid colonization of the surface by *L. sakei*. This article presents an integrated model which combines the simulation of water activity and NaCl mass fraction at the surface of DIS-treated meat fillets with the simulation of *L. sakei* growth on this surface. The model was successfully confronted with experimental data and then used to assess the potential of different DIS treatments to be coupled with fermentation by *L. sakei*.

Highlights

- Integrated model to optimize DIS and fermentation coupling in the treatment of meat
- Mass transfer model to describe surface a_w and salt content
- Modelling *Lactobacillus sakei* growth on meat surface as a function of a_w and salt

Keywords

Keywords: dehydration, salting, mass transfer, *Lactobacillus sakei*, surface growth, integrated model.

Nomenclature

CFU	Colony Forming Unit
DE	Dextrose Equivalent
DIS	Dehydration-Impregnation by Soaking
PDE	Partial Differential Equation
SaC	Salt Content
SaG	Salt Gain
w.b.	wet basis
WC	Water Content
WL	Water Loss
Symbols	
a_w	[-] water activity
	[m ² /s] effective diffusion coefficient
m	[mol/kg] molality
L	[m] thickness of meat fillet
N	[CFU/cm ²] number of cells per square centimeter
t	[s] time
T	[°C] temperature
w	[-] mass fraction
z	[m] position within the meat fillet
Greek symbols	
α	[-] primary model curvature parameter of transition from lag to exponential phase
γ	[-] function describing the effect of environmental factors on primary model parameter (μ_{\max}, λ)
λ	[h] duration of the lag phase
μ_{\max}	[h ⁻¹] maximum specific growth rate
Upper and lower scripts	
0	initial time, center position
∞	boundary condition
DE 21	DE 21 glucose syrup
max	maximum
opt	optimum
ref	reference
w	water
w bound	bound water

1. Introduction

Hurdle technology is the combination of gentle but effective preservation methods to ensure the microbial safety and stability of food products. The most important hurdles are: temperature, water activity, pH, redox potential, preservatives and competitive microorganisms (Leistner, 2000). This last hurdle is strongly influenced by the others, as the growth of microorganisms is a function of the physicochemical properties of the environment surrounding the cells. Based on the premise that this response is highly reproducible (Ross & McMeekin, 2003), predictive microbiology uses mathematical models to correlate microbial growth to environmental factors. During food processing, environmental factors vary as a function of time or space within the product and models for heat and mass transfers, chemical reactions, etc. are required to describe these changes. An integrated approach combining these models with microbial models allows the description of microbial growth in a dynamic environment. This approach has already been used by several authors. Amézquita *et al.* (2005) incorporated a heat transfer model to describe the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. Aldarf *et al.* (2006) examined substrate and metabolite diffusion within a model medium for soft cheese in relation to the growth of *Penicillium camembertii*. Lebert *et al.* (2007b) used a water transfer model to describe the evolution of surface water activity as a result of drying and modeled the corresponding surface growth of *Listeria innocua*. Noriega *et al.* (2008) modeled the growth of *Listeria* as a function of oxygen diffusion within a gelled medium.

Either through naturally occurring fermentations or through the use of selected starter strains, lactic acid bacteria have extensive applications as competitive microorganisms in a wide range of fermented foods (Ross *et al.*, 2002). In fermented meats, one of the most frequently found bacteria is *Lactobacillus sakei* owing to its adaptation to the meat environment and to the conditions prevailing during the processing of fermented meat products (Leroy *et al.*, 2006; Hüfner *et al.*, 2007). In previous research (Bros *et al.*, 2012), *L. sakei* has been examined through its capability to grow on the surface of meat pre-treated by Dehydration-Impregnation by Soaking (DIS). The end goal is to produce a shelf-stable and ready-to-eat meat product with final

characteristics chosen within the range of intermediate moisture products (Girard, 1988; Nortjé *et al.*, 2005; Santchurn *et al.*, 2011) that is, a salt content of 4 % wet basis (w.b.) and a water content of 50 % (w.b.). The process detailed in Bros *et al.* (2012), consists of three steps:

- a DIS treatment in concentrated ternary water-salt-sugar solutions to pre-stabilize (reduction of water activity) and formulate (incorporation of salt and sugars) the meat, and followed by a rest period to equilibrate water, salt and sugars contents within the product,
- a surface fermentation with a *L. sakei* starter to stabilize the product (colonization of the surface, reduction of pH, production of organic acids and bacteriocins) and to produce characteristic flavor compounds,
- an air-drying step to complete the stabilization of the product and to modulate its characteristics in terms of water and salt contents and flavor compounds issuing from fermentative metabolism.

In the coupling of DIS and *L. sakei* surface growth, the challenge is to formulate the meat by DIS in a way that will favor a rapid colonization of the surface by *L. sakei*. Thus, an integrated model is elaborated in order to bring answers to the following interrogations. Which DIS treatment conditions (immersion time and salt concentration of the immersion solution) are best adapted for the rapid colonization of the surface by *L. sakei*? How long should the equilibration period be (if present) after DIS treatment and before inoculating the surface?

The model is constructed by assembling the following building blocks:

- A mass transfer model simulates the variation, during DIS and equilibration, of the water and salt composition of the meat. The resulting water activity is determined using the model of Van der Sman & Boer (2005).
- A microbial growth model, developed in Bros *et al.* (submitted) using a model-food approach, comprises a secondary growth model based on the γ -concept (Zwietering *et al.*, 1996), to describe the effect of environmental factors on the duration of the lag phase

and the maximum specific growth rate, and a primary growth model (Huang, 2008) to determine the evolution of the *L. sakei* population.

This integrated model is used to assess the outcome of several situations combining a DIS treatment, an equilibration period and a surface fermentation by *L. sakei*.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental setup

The experimental setup is detailed in Bros *et al.* (2012) and briefly explained hereafter.

Fillets ($7 \times 5 \times 1 \times 10^{-2}$ m) cut from beef muscle *semitendinosus* (eye of round) were treated by DIS at 25 °C in concentrated immersion solutions of water, NaCl and dextrose equivalent 21 (DE 21) glucose syrup (Glucidex® IT21, Roquette, Lestrem, France). A detailed composition of the DE 21 glucose syrup can be found in Santchurn *et al.* (2007). The conditions of the DIS treatments hereafter named A, B, C, D1, D3 and D5 are found in the left-hand side of Table 2. At the end of DIS treatments, the fillets were removed from the baths and placed at 4 °C for 18 h to equilibrate sugar and salt concentrations within the fillets. Fillets issued from treatments A were surface-inoculated at 10^6 CFU/g with an *L. sakei* starter and incubated at 25 °C, 98 % RH (relative humidity) for 24 h.

Samples were taken before and after DIS treatments, and during incubation after inoculation with *L. sakei*. For each sampling time, three fillets were analyzed. Physicochemical analysis comprised moisture content, water activity and salt content. Lactic acid bacteria were counted on de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS).

2.2. Pathogen growth simulation

Sym'Previous software (<http://www.symprevious.org/>) (Leporq *et al.*, 2005) was used as a tool to analyze the incidence of DIS treatment on the maximum specific growth rates of *Salmonella* and *Escherichia coli* and compare them with the response of *L. sakei*. The reference maximum specific growth rates were of 0.67 h^{-1} for *E. coli* (Juneja *et al.*, 2009) and 0.83 h^{-1} for *Salmonella* (Huang, 2010). The growth simulation module of Sym'Previous was used with the following settings: an initial load of 10^2 CFU/g, fixed pH and temperature values of 5.60 and 25°C respectively and varying conditions of water activity.

2.3. Model development

2.3.1. *Mass transfer model.* In order to describe the evolution of water and salt mass fractions within the fillets during DIS and equilibration, the following assumptions were used:

- (A1) The dimensions of the meat fillets were chosen so that they could be considered as semi-infinite slabs, with a thickness $L = 1 \times 10^{-2}$ m small in comparison to the width and length.
- (A2) The meat matrix was considered as homogenous without any shrinkage or chemical reaction.
- (A3) The sugars in the DE 21 glucose syrup were considered to not penetrate the meat during DIS because of the high molecular mass of most of them.
- (A4) During DIS, because the immersion solution is well stirred, NaCl concentration in the liquid just adjacent to the meat surface was considered equal to NaCl concentration in the meat at the interface (no concentration boundary effect). The water activity of the meat surface was assumed to be equal to that of the immersion solution.
- (A5) Water and NaCl transport were described by a pseudo-binary diffusion model and characterized by water and NaCl effective diffusion coefficients, D_w^{eff} and $D_{\text{NaCl}}^{\text{eff}}$, respectively, independent of water and salt mass fractions (w_i and w_{NaCl}).

The basic partial differential equations (PDE) for this problem are those of a slab:

$$\frac{\partial w_i}{\partial t} = D_i^{\text{eff}} \frac{\partial^2 w_i}{\partial z^2} \quad (i = \text{eau} ; \text{NaCl}) \quad (1)$$

subject to the following conditions:

$$t = 0 \quad \text{all } z \quad w_i = w_i^0 \quad \text{with } w_w^0 = 0.75 \text{ and } w_{\text{NaCl}}^0 = 0 \quad (2)$$

$$t_{\text{DIS}} \geq t > 0 \quad z = 0 \quad \frac{\partial w_i}{\partial z} = 0 \quad (3a)$$

$$z = L/2 \quad w_i = w_i^\infty \quad (3b)$$

$$t > t_{\text{DIS}} \quad z = 0 \quad \frac{\partial w_i}{\partial z} = 0 \quad (4a)$$

$$z = L/2 \quad \frac{\partial w_i}{\partial z} = 0 \quad (4b)$$

Here $z = 0$ corresponds to the center of the fillets and $z = L/2$ to the surface, w_i is the boundary condition for water or NaCl mass fraction, t_{DIS} is the duration of DIS treatments followed by the equilibration period ($t > t_{\text{DIS}}$) during which there is no mass flux at the interface.

The water activity of DIS solutions was determined using the model of Deumier & Bohuon (2005):

$$a_w = 1 - 3.14 \cdot 10^{-2} m_{\text{NaCl}} - 1.08 \cdot 10^{-2} m_{\text{DE21}} - 1.43 \cdot 10^{-3} m_{\text{NaCl}}^2 - 1.10 \cdot 10^{-2} m_{\text{DE21}}^2 + 2.65 \cdot 10^{-3} m_{\text{NaCl}} m_{\text{DE21}} \quad (5)$$

Here m_{NaCl} and m_{DE21} are the molalities (mol/kg of water) of NaCl and DE 21 glucose syrup. To calculate m_{DE21} , the median molecular mass of 1007 g/mol for the DE 21 glucose syrup was used in accordance with Deumier & Bohuon (2005).

The model of Van der Sman & Boer (2005) was used in the simulation of the water activity of meat:

$$a_w = \frac{(w_w - w_{w \text{ bound}})}{[(w_w - w_{w \text{ bound}}) + \frac{18.02}{58.44} w_{\text{NaCl}} \times 1]} \quad (6a)$$

$$w_{w \text{ bound}} = 0.3 w_{\text{proteins}} + 0.1 w_{\text{sugars}} \quad (6b)$$

Here w_w [-] is the mass fraction of water, $w_{w \text{ bound}}$ is the mass fraction of bound water, w_{NaCl} is the NaCl mass fraction, w_{proteins} and w_{sugars} are the mass fractions of proteins and sugars respectively, with $w_{\text{proteins}} = 0.25$ and w_{sugars} considered to be equal to 0 according to the assumption (A3).

2.3.2. Microbial growth model. The microbial model previously developed in Bros *et al.* (submitted) will be briefly detailed hereafter. The primary model of Huang (2008) inspired from the model of Baranyi & Roberts (1994) was used in its differential form to describe the evolution of the number of cells per square centimeter ($N(t)$) [CFU/cm²] as a function of time (t) [h].

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{\max} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[-\alpha(t - \lambda)]} \right\} \left(1 - \frac{N(t)}{N_{\max}} \right) N(t) \quad (7)$$

with initial conditions ($t = 0$) $N = N_0$ where N_0 [CFU/cm²] is the initial number of cells per square centimeter. The first term in the right hand side of Eq. (7), the maximum specific growth rate (μ_{\max}) [h⁻¹], describes the exponential growth phase. The second term, the adjustment function, describes the lag phase with a curvature parameter (α) [-] and by explicitly showing the duration of the lag phase (λ) [h]. The value of α was set to 61 (Bros *et al.*, submitted). The third term, the logistic inhibition function, describes the stationary phase by means of the maximal number of cells per square centimeter (N_{\max}) [CFU/cm²].

The γ -concept (Zwietering *et al.*, 1996) states that the dependence of the maximum specific growth rate to a combination of environmental factors can be found by multiplying an optimal maximum specific growth rate by the effects of the separate factors. The effects are given by dimensionless functions scaled between 0 and 1. This concept was used as a basis to describe the effect of water activity and NaCl, on primary model parameters λ and μ_{\max} .

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{1}{\lambda_{\text{opt}}} \gamma_{\lambda}(a_w) \gamma_{\lambda}(\text{NaCl}) \quad (8a)$$

$$\mu_{\max} = \mu_{\max \text{ opt}} \gamma_{\mu \max}(a_w) \gamma_{\mu \max}(\text{NaCl}) \quad (8b)$$

The values for $\lambda_{\text{opt}} = 0.69 \text{ h}$ and $\mu_{\text{max,opt}} = 0.79 \text{ h}^{-1}$ were taken equal to $\mu_{\text{max,ref}}$ and λ_{ref} from Bros *et al.* (submitted). For each environmental factor, the γ -functions were given by second-degree equations and their coefficients are shown in Table 1.

Table 1. Coefficients of the γ -functions determined in Bros *et al.* (submitted) relative to the primary model parameters: the duration of the lag phase (λ) and the maximum specific growth rate (μ_{max}).

γ -function	Factor	Coefficients		
		a	b	c
γ_{λ}	a_w	-278	556	-277
	NaCl	0.02	-0.29	1.00
$\gamma_{\mu_{\text{max}}}$	a_w	-278	556	-277
	NaCl	-0.02	0.00	1.00

For each line, a, b and c are the coefficients in $\gamma = ax^2 + bx + c$ where x is a_w or NaCl.

2.3.3. Model implementation. The system consisted of three variables: the water and NaCl mass fractions at different positions within the fillets (w_w and w_{NaCl}) and the *L. sakei* population (N). The two PDEs (Eq. 1) were solved using a commercial code based on the finite element method (FEM-based code) (Comsol Multiphysics® version 3.5, Comsol Inc., Stockholm, Sweden) with the boundary conditions given in Eqs. (2) through (4). The meshing of the slab representing the meat fillet was created by Comsol Multiphysics® (30 elements). Convergence of the numerical results was verified. Lagrange polynomials (second-order functions) were used as the interpolation functions. The linearized problem was solved at each step by the *UMFPACK* method. Surface profiles after DIS treatments and during equilibration (w_w and w_{NaCl} at $z = L/2$) were then incorporated into the microbial growth model through the γ -functions using a script in Matlab® software version 6.5 (Matlab®, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) thus generating $\lambda(t)$ and $\mu_{\text{max}}(t)$ data. The non-linear ordinary differential equation (ODE) to calculate $N(t)$ was carried out with the Matlab® function *ode15s*.

3. Results and Discussion

3.1. DIS treatments

DIS treatments A, B, and C shown in Table 2 were conceived to lead to the same salt gain of 2.2 % with increasing water losses: 18.0 % for A (theoretical 20 %), 31.0 % for B (theoretical 30 %) and 38.3 % for C (theoretical 40 %). The use of a ternary water-salt-sugar immersion solution enables these effective water losses while limiting salt gain (Collignan & Raoult-Wack, 1994; Santchurn *et al.*, 2007). Nevertheless, longer immersion times were still required to reach water losses as pronounced as 30 and 40 % which is why immersion times for treatments B and C were of 18 and 30 h. The amount of NaCl in the immersion solutions was consequentially lower (75 g/kg of water for B and 87.5 g/kg water for C) than for treatment A (100 g/kg water) to ensure that salt gain would still be at the target value of 2.2 %. Treatments of the D series used shorter immersion times (1, 3 and 5 h) and a higher amount of salt in the immersion solution (175 g/kg of water). Consequently, a salt gain of 2.1 % was reached after one hour of immersion (treatment D1) while the water loss was only of 10.9 %. Treatments D3 and D5 showed water losses of the same order of magnitude as that of treatment A, but with higher salt gains of 3.4 and 3.9 % for D3 and D5 respectively.

Table 2. Experimental treatment conditions: treatment temperature (T), immersion time (t), water activity of the bath (a_w) and glucose syrup and salt contents in the baths (DE 21, NaCl), mass transfers: water loss (WL), salt gain (SaG), and product characteristics: water activity (a_w), water content (WC), salt content (SaC) corresponding to Dehydration-Impregnation by Soaking treatments A, B, C, D1, D3 and D5 in ternary solutions of water, DE 21 glucose syrup and NaCl. Results are shown as mean (standard deviation) with $3 \leq n \leq 15$.

DIS treatment conditions				Mass transfers during DIS						Product characteristics					
DIS	T	t	a_w	DE21	NaCl	WL	SaG			a_w	WC	SaC			after drying**
	(°C)	(h)		(g/kg water)		(% initial mass)						(% w.b.)			
A	25	5	0.926	950	100	18.0 (0.8)	2.0 (0.2)	0.975 (0.001)	64.9 (0.8)	2.72 (0.12)	3.87				
B	25	18	0.941	950	75	31.0 (1.5)	2.1 (0.1)	0.970 (0.003)	58.8 (1.5)	2.86 (0.25)	3.47				
C	25	30	0.934	950	87.5	38.3 (1.5)	2.3 (0.1)	0.956 (0.002)	53.6 (1.3)	3.61 (0.10)	3.89				
D1*	25	1	0.881	950	175	10.9 (1.0)	2.1 (0.1)	0.977 (0.014)	69.5 (1.0)	2.38 (0.06)	3.91				
D3*	25	3	0.881	950	175	19.7 (2.6)	3.4 (0.2)	0.962 (0.009)	64.7 (2.4)	4.11 (0.30)	5.83				
D5*	25	5	0.881	950	175	23.5 (0.5)	3.9 (0.2)	0.944 (0.017)	62.1 (1.1)	4.81 (0.17)	6.34				

* Data concerning treatments of the D series was issued from Santchurn *et al.* (2007).

** Salt contents after drying were estimated from water and salt contents after DIS and considering a final water content after drying of 50 % w.b.

Rao (1997) illustrated that there are different ways to arrange hurdles within a food process. In this case, the purpose of DIS, as suggested by the water activity of meat fillets after the treatments, which ranged between 0.944 and 0.977, was to pre-stabilize and formulate the meat in preparation for the following fermentation and drying steps where other protection hurdles are established.

3.2. Mass transfer model

Figure 1 shows the experimental and simulated water loss and salt gain during DIS treatments. The simulation using the conditions detailed in Table 3 fitted the experimental data in a satisfactory way. Santchurn (2009) observed that for prolonged DIS treatment times, near equilibrium, salt gain eventually decreases. This was not taken into consideration here.

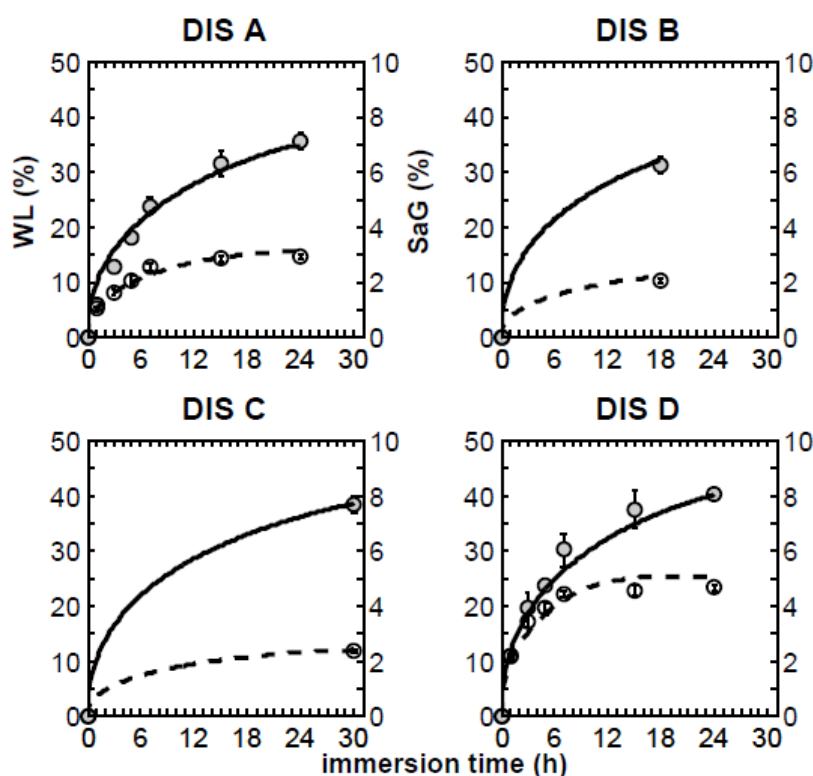


Figure 1. Experimental and simulated data for water loss (WL) (left axis, full circles —) and salt gain (SaG) (right axis, empty circles —) during Dehydration-Impregnation by Soaking treatments in ternary solutions of water, NaCl and DE 21 glucose syrup. When present, the error bars represent the standard deviation with $3 \leq n \leq 15$. All treatments use 950 g/kg water of DE 21 glucose syrup and NaCl contents in g/kg water are as follows: A (100), B (75), C (87.5) and D (175). Experimental data for treatment D is issued from Santchurn *et al.* (2007).

The diffusion coefficients shown in Table 3 were consistent with values found in other studies (Doulia *et al.*, 2000; Santchurn, 2009). Moreover, these authors also find, as was the case here, that diffusion coefficients are higher for NaCl than for water. This might be due to the fact that, while water diffuses as a single molecule, NaCl diffuses as Na^+ and Cl^- with a diffusion coefficient which is the average of the coefficients of the separate ions (Cussler, 1997).

Table 3. Input parameters used in simulation of mass transfer occurring during Dehydration-Impregnation by Soaking treatments.

DIS	Boundary conditions		$(\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s})$	
			water	NaCl
A	0.538	0.051	1.5	2.5
B	0.529	0.042	1.2	1.8
C	0.510	0.044	1.1	1.6
D series	0.480	0.080	1.5	3.5

Figure 2 presents the simulated water activity and NaCl profiles during DIS treatment A (5 h) and the equilibration period that follows (18 h) for different positions within the meat fillets from the center to the surface.

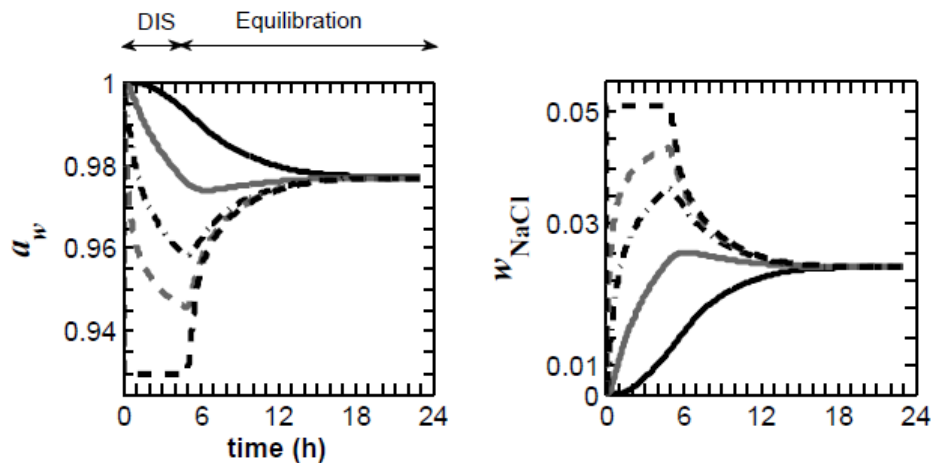


Figure 2. Simulated water activity and NaCl mass fraction profiles during Dehydration-Impregnation by Soaking treatment A (5 h immersion, DE 21 glucose syrup 950 g/kg water, NaCl 100 g/kg water) and equilibration (18 h) at different positions within the meat fillet. $z = 0 \text{ mm}$ (center) (—), $z = 3 \text{ mm}$ (---), $z = 4 \text{ mm}$ (- · -), $z = 4.5 \text{ mm}$ (---), and $z = 5 \text{ mm}$ (surface) (· · ·).

For the water activity, the lines for the different positions converged towards $a_w = 0.977$, the equilibrium value, which was reached around 17 h, after 5 h of DIS treatment and 12 h of equilibration. For the NaCl mass fraction, the lines converge towards $w_{\text{NaCl}} = 0.022$ which was

reached around 16 h, after 11 h of equilibration. There was a slight discrepancy between the simulated equilibrium values and the characteristics shown in Table 2 which were experimentally measured: $a_w = 0.975$ and $w_{\text{NaCl}} = 0.027$. For all other DIS treatments, the equilibrium was also reached before 18 h and there was also a discrepancy between the simulated water activity and NaCl mass fraction equilibrium values and the product characteristics shown in Table 2. Concerning water activity, the discrepancy is acceptable with regard to the precision of water activity measurement. Concerning NaCl, the growth model for *L. sakei* developed in Bros *et al.* (submitted) showed that for NaCl mass fractions values around 0.02 a 20 % variation would not significantly impact the growth of *L. sakei*. Therefore the model simulation of surface water activity and NaCl mass fraction is deemed acceptable and the data can be incorporated into the microbial model.

3.3. Integrated model confrontation with DIS-fermentation trials

Figure 3 shows the model simulation of *L. sakei* growth on the surface of meat pre-treated with DIS A (5 h) and equilibrated for 18 h. This model simulation is calculated using the experimental equilibrium values for water activity and salt content shown in Table 2 ($a_w = 0.975$ SaC = 2.72 % w.b.). MRS counts at 0 and 24 h were used as the initial and maximum *L. sakei* populations ($N_0 = 7.4 \cdot 10^6$ CFU/cm² $N_{\text{max}} = 6.9 \cdot 10^7$ CFU/cm²). The model simulation, which gives $\lambda = 2.17$ h and $\mu_{\text{max}} = 0.57$ h⁻¹, fits this data quite satisfactorily. These consistent results proved that the microbial model constructed in Bros *et al.* (submitted) using a model-food approach can be used to describe real situations of *L. sakei* growth on the surface of DIS-treated meat.

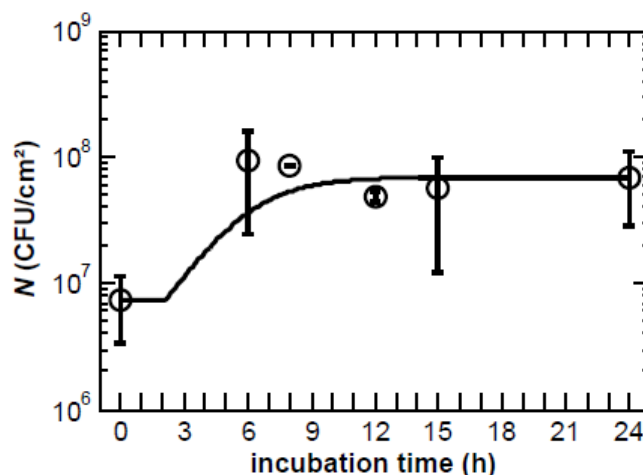


Figure 3. *Lactobacillus sakei* growth on meat surface after Dehydration-Impregnation by Soaking treatment A (5 h immersion, DE 21 glucose syrup 950 g/kg water, NaCl 100 g/kg water) and equilibration (18 h). Experimental data (\circ), model simulation ($—$). When present, the error bars represent the standard deviation with $2 \leq n \leq 4$.

Concerning DIS treatments B and C, according to the characteristics shown in Table 2, the model predicts growth with $\lambda = 2.59$ h, $\mu_{\max} = 0.50$ h⁻¹ for treatment B and $\lambda = 5.82$ h, $\mu_{\max} = 0.29$ h⁻¹ for treatment C. However, this prediction cannot be confronted with experimental data. Indeed the too long immersion times (18 h for B and 30 h for C, in addition to 18 h of equilibration in both cases) lead to an uncontrolled proliferation of the endogenous flora of the meat which would prevent any fermentative process. It was therefore concluded in Bros *et al.* (2012), that DIS treatment should be constructed to use shorter immersion times and higher salt content in the immersion solution.

3.4. Integrated model used to assess the potential of DIS treatments to support a successful surface growth of *L. sakei*

In the following section, the integrated model was used to assess the potential of DIS treatments of the D series (Table 2), which use higher salt contents in the immersion solution and shorter immersion times, to support a subsequent growth of *L. sakei*. Figure 4 shows the evolution of surface water activity and NaCl mass fraction after DIS treatments and during the equilibration period of 18 h and the resulting simulated primary model parameters λ and μ_{\max} . Data is also

shown for DIS treatment A as a reference, given that successful growth of *L. sakei* was demonstrated after this DIS treatment followed by 18 h of equilibration.

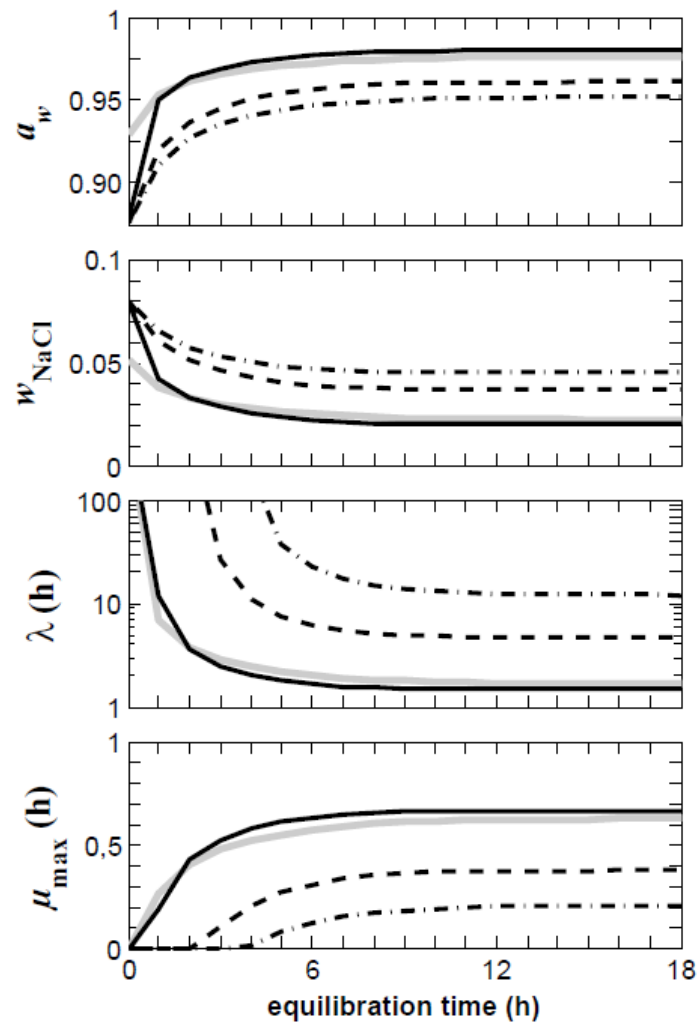


Figure 4. Simulated surface water activity (a_w) and NaCl mass fraction (w_{NaCl}) and resulting primary model parameters (λ : duration of the lag phase and μ_{max} : maximum specific growth rate) of the surface growth of *Lactobacillus sakei* during equilibration after Dehydration-Impregnation by Soaking treatments in ternary solutions of water, NaCl and DE 21 glucose syrup. All treatments use 950 g/ kg water of DE 21 glucose syrup and immersion times and NaCl contents in g/kg water are as follows: A (5 h; 100) (—), D1 (1 h; 175) (— · —), D3 (3 h; 175) (---) and D5 (5 h; 175) (- · -).

3.4.1. Duration of the equilibration period. It appears that the water activity and NaCl equilibration profiles and the resulting primary model parameters varied greatly in the first five hours of equilibration and very little afterwards. Therefore, it is possible to reduce the equilibration time from the 18 hours that were used in Bros *et al.* (2012) to five hours. Experimental data is then needed to assess whether it is best to inoculate the surface of fillets with *L. sakei* immediately after DIS treatment or if a rest period of a few hours should be

observed to prevent extensive injury of the bacterial cells. Also, knowledge of water activity and salt surface characteristics of the meat at the time of inoculation could be used to stress-condition the *L. sakei* starter culture to improve its performance as suggested by Hübner & Hertel (2008) for raw sausage fermentation.

3.4.2. Choice of immersion time. Concerning the choice of the immersion time for DIS D between 1, 3 or 5 h, both microbial and physicochemical data must be taken into consideration. Primary model parameters are, at best (after 18 h of equilibration), equal to $\lambda = 4.73$ h, $\mu_{\max} = 0.38$ h⁻¹ and $\lambda = 12.11$ h, $\mu_{\max} = 0.21$ h⁻¹ for treatments D3 and D5 respectively. These values suggested a difficult growth of *L. sakei* after these two treatments. Moreover, the calculated salt contents after dehydration to 50 % water content are of 5.83 and 6.34 % (w.b.) for treatments D3 and D5 respectively (Table 2). These values are above the targeted final salt content of 4 % (w.b.) also suggesting that these two treatments do not correspond with the end goal of producing a shelf-stable and ready-to-eat meat.

Inoculation immediately after DIS creates a protection hurdle due to the presence of high levels of *L. sakei*. However the question is whether the conditions on the surface immediately after DIS would not induce a too important perturbation of the growth of *L. sakei*. Further experimentation is required to assess whether it is best to inoculate the meat immediately after DIS or to perform a five-hour equilibration. After the greatly varying first hours of equilibration, treatment D1 presents profiles and resulting primary model parameters very similar to those found in treatment A (Figure 4). As successful growth of *L. sakei* was shown after DIS treatment A and 18 h of equilibration, it is likely that it will also be the case after DIS treatment D1 and 1-2 h of equilibration. In addition, treatment D1 would lead to a final salt content after drying of 3.91 % (w.b.) (Table 2). This value is close to the one resulting from treatment A and is consistent with the targeted 4 % confirming that treatment D1 is a viable option for the coupling with surface fermentation by *L. sakei*.

3.4.3. L. sakei growth compared to two meat-borne pathogens. Figure 5 shows the evolution of water activity during the equilibration for DIS treatments A and D1 and the resulting simulated

maximum specific growth rates for *L. sakei* using the integrated model and for *E. coli* and *Salmonella* using the Sym'Previus software.

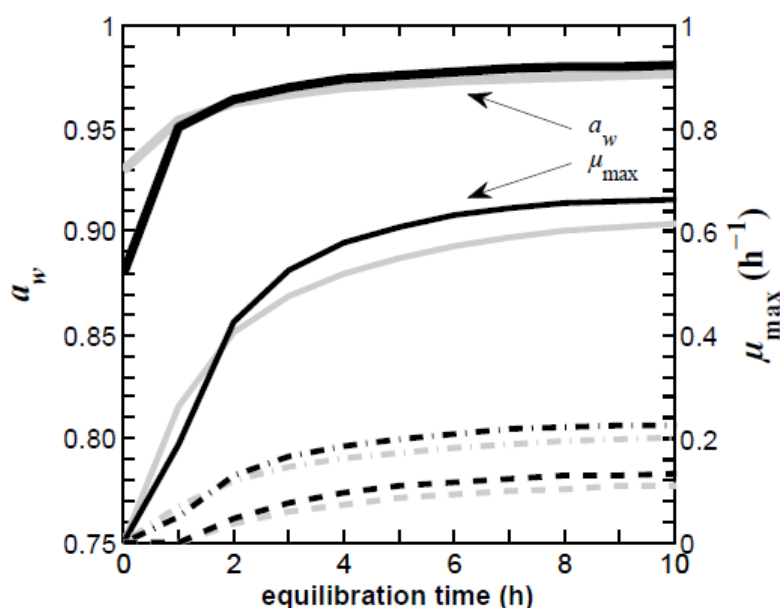


Figure 5. Simulated surface water activity (a_w) and resulting maximum specific growth rates (μ_{\max}) during equilibration after Dehydration-Impregnation by Soaking treatments in ternary solutions of water, NaCl and DE 21 glucose syrup. All treatments use 950 g/ kg water of DE 21 glucose syrup and immersion times and NaCl contents in g/kg water are as follows: A (5 h; 100), D1 (1 h; 175). The gray lines correspond to treatment A and the black lines to treatment D1: a_w (—), *Lactobacillus sakei* (—), *Salmonella* (— ·) and *Escherichia coli* O157:H7 (— —).

Maximum specific growth rates in untreated meat were in the order *Salmonella* > *L. sakei* > *E. coli* (§2.2 and §2.3.2). Once a DIS treatment was applied, it appeared that *L. sakei* was always the fastest growing microorganism throughout the entire equilibration period. This held true for both treatments A and D1: as these treatments lead to similar water activity equilibration profiles (§3.4.2), the simulated maximum specific growth rates for each of the studied bacteria was also similar from one treatment to the other. However, information on the maximum specific growth rate alone is not sufficient and the analysis of the duration of the lag phase is fundamental to assess whether *L. sakei* will colonize the environment over the spoilage flora and pathogens. These interactions between *L. sakei* and other flora must be studied experimentally using realistic inoculation levels: an elevated level around 10^6 CFU/g for *L. sakei* and a low level around 10^2 CFU/g for the spoilage or pathogen microorganism. Indeed as shown by Francois *et al.* (2005) the probability of growth is highly dependent on the initial load.

Moreover, the inhibitory role of *L. sakei* towards spoilage and pathogen microorganisms through the production of lactic acid and bacteriocins should also be taken into consideration when studying microbial interactions (Janssen *et al.*, 2006).

4. Conclusion

This article presents an integrated model which combines the simulation of water activity and NaCl mass fraction at the surface of DIS-treated meat fillets with the simulation of *L. sakei* growth on this surface. The model was successfully confronted with experimental data and subsequently used to assess the potential of different DIS treatments to be coupled with fermentation by *L. sakei*. The model gives results which strengthen prior findings that shorter DIS treatment with higher amounts of salt in the immersion solution would give better results when associated with a subsequent fermentation step. Thus, the model constitutes a useful decision-making tool to efficiently build and optimize an otherwise complex processing situation before embarking in time consuming trials.

In further research, the microbial model will be improved to incorporate the self-inhibiting nature of the fermentation process by adding the γ -functions corresponding to the effect of pH and lactic acid variations into the secondary growth model. The mass transfer model will be improved by a better estimation of boundary conditions, and by taking into consideration the cross diffusion coefficients of NaCl and lactic acid. Finally, while the drying step has so far been considered separately from the fermentation step, they actually take place simultaneously. Thus the mass transfer model has to take into consideration the reduction of water activity as a consequence of the drying of the surface.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conseil Régional de la Réunion who provided financial support for this study.

References

- Aldarf, M., Fourcade, F., Amrane, A., Prigent, Y. 2006. Substrate and metabolite diffusion within model medium for soft cheese in relation to growth of *Penicillium camembertii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33, 685-692.
- Amézquita, A., Weller, C.L., Wang, L., Thippareddi, H.H., Burson, D.E. 2005. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology* 101, 123-144.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Bros, M., Arnaud, E., Bohuon, P., Loiseau, G., Talon, R., Collignan, A. submitted. Modelling the effects of water activity, salt, pH, and lactic acid on *Lactobacillus sakei* surface growth using an original device.
- Bros, M., Arnaud, E., Loiseau, G., Talon, R., Collignan, A. 2012. Feasibility of Coupling Dehydration-Impregnation by Soaking Treatment of Meat with Fermentation by *Lactobacillus sakei*. *Journal of Food Science* 77, M434-M440.
- Collignan, A., Raoult-Wack, A.-L. 1994. Dewatering and salting of cod by immersion in concentrated sugar/salt solutions. *LWT - Food Science and Technology* 27, 259-264.
- Cussler, E.L. 1997. Diffusion of Interacting Species, Diffusion - Mass Transfer in Fluid Systems, Second ed. Cambridge University Press, Cambridge. 142-184.
- Deumier, F., Bohuon, P. 2005. Densities, viscosities and water activities of ternary NaCl-glucose syrup-water systems from 283.1 to 298.1 K. *Journal of Food Engineering* 68, 377-383.
- Doulia, D., Tzia, K., Gekas, V. 2000. A knowledge base for the apparent mass diffusion coefficient (DEFF) of foods. *International Journal of Food Properties* 3, 1-14.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M. 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 100, 41-53.
- Girard, J.P. 1988. La Déshydratation. In: Girard, J.P., (Ed.), *Technologie de la viande et des produits carnés*. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 83-116.
- Goffin, P., Deghorain, M., Mainardi, J.-L., Tytgat, I., Champomier-Vergès, M.-C., Kleerebezem, M., Hols, P. 2005. Lactate Racemization as a Rescue Pathway for Supplying d-Lactate to the Cell Wall Biosynthesis Machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 187, 6750-6761.
- Huang, L. 2008. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters - Determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions. *Journal of Food Science* 73, E235-E242.
- Huang, L. 2010. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. *International Journal of Food Microbiology* 140, 40-48.
- Hüfner, E., Hertel, C. 2008. Improvement of raw sausage fermentation by stress-conditioning of the starter organism *Lactobacillus sakei*. *Current Microbiology* 57, 490-496.
- Hüfner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq, A.-M., Zagorec, M., Hertel, C. 2007. Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2522-2531.
- Janssen, M., Geeraerd, A.H., Logist, F., De Visscher, Y., Vereecken, K.M., Debevere, J.M., Devlieghere, F., Van Impe, J.F. 2006. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in

- coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. *International Journal of Food Microbiology* 111, 59-72.
- Juneja, V.K., Valenzuela Melendres, M., Huang, L., Subbiah, J., Thippareddi, H.H. 2009. Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45 °C. *International Journal of Food Microbiology* 131, 106-111.
- Lebert, I., Nicolas, C., Portanguen, S., Lebert, A. 2007. Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process. *Journal of Food Engineering* 78, 1371-1381.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.
- Leporq, B., Membré, J.-M., Dervin, C., Buche, P., Guyonnet, J.P. 2005. The "Sym'Previus" software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *International Journal of Food Microbiology* 100, 231-237.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285.
- Noriega, E., Laca, A., Díaz, M. 2008. Modelling of diffusion-limited growth to predict *Listeria* distribution in structured model foods. *Journal of Food Engineering* 87, 247-256.
- Nortjé, K., Buys, E.M., Minnaar, A. 2005. Effect of [gamma]-irradiation on the sensory quality of moist beef biltong. *Meat Science* 71, 603-611.
- Rao, D.N. 1997. Intermediate moisture foods based on meats—a review. *Food Reviews International* 13, 519-551.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3-16.
- Ross, T., McMeekin, T.A. 2003. Modeling Microbial Growth Within Food Safety Risk Assessments. *Risk Analysis* 23, 179-197.
- Santchurn, S.J., Arnaud, E., Zakhia-Rozis, N., Collignan, A. 2011. Drying: Principles and Applications. In: Hui, Y.H., (Ed.), *Handbook of Meat and Meat Processing*, Second Edition ed. CRC Press, Boca Raton. 505-522.
- Santchurn, S.J., Collignan, A., Trystram, G. 2007. Impact of solute molecular mass and molality, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution. *Journal of Food Engineering* 78, 1188-1201.
- Van der Sman, R.G.M., Boer, E. 2005. Predicting the initial freezing point and water activity of meat products from composition data. *Journal of Food Engineering* 66, 469-475.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Notermans, S. 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.

III.3.3. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

III.3.3.1. RÉSULTATS DÉVELOPPÉS DANS L'ARTICLE

Le modèle de croissance en surface de *L. sakei* mis au point en milieu modèle (Section III.2) est mis à l'épreuve et décrit de manière satisfaisante une situation sur aliment réel : le cas de filets de viande traités par DII A (5 h d'immersion, NaCl 100 g/kg d'eau, DE 21 950 g/kg d'eau) équilibrés pendant 18 h avant d'être inoculés en surface avec *L. sakei*.

De plus, il est avancé dans la conclusion de l'article 1 (Section III.1) que des traitements de DII courts et mettant en œuvre des solutions d'immersion avec des concentrations en sel plus élevées seraient favorables à la bonne conduite de l'étape de fermentation. En accord avec cette hypothèse, le modèle global est utilisé et montre le bon potentiel de croissance de *L. sakei* à la surface de filets de viande immergés pendant 1 h dans une solution contenant 175 g/kg d'eau de NaCl et 950 g/kg d'eau de DE 21.

III.3.3.2. CONCLUSION

Le modèle global de croissance de *L. sakei* sur une viande pré-traitée par DII constitue un outil d'aide à la décision pour l'optimisation du couplage DII-fermentation. Ce modèle pourra être enrichi en incorporant l'influence de l'acide lactique en fonction de sa production et de sa diffusion entre la surface et le cœur de la viande. Il sera alors possible de déterminer quelles sont les meilleures conditions de DII pour favoriser la croissance de *L. sakei* par rapport à une flore pathogène au travers de la colonisation de la surface et de la production d'acide lactique.

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail s'inscrit dans un projet dont l'objectif est la conception d'un procédé innovant basé sur la théorie des barrières pour obtenir un produit carné salé-séché-fermenté stable à température ambiante et prêt-à-consommer. Le procédé doit être compatible avec les conditions tropicales ou des pays du Sud dans lesquelles l'altération de la viande est accrue et où la matière première peut-être de qualité microbiologique irrégulière. Ce procédé se centre sur une pré-stabilisation rapide à température ambiante de morceaux de viande de petite taille en couplant une étape de DII en solution ternaire eau-sel-sucres à une fermentation lactique de surface par une flore bénéfique, *L. sakei*. Ce couplage DII-fermentation se complète par une étape de séchage à l'air.

L'ambition de ce travail est de déterminer comment aboutir à un couplage DII-fermentation efficace. Cette efficacité est conditionnée par la capacité de *L. sakei* à se développer à la surface d'une viande ayant subi un traitement de DII. Cependant, la croissance sur cette surface est complexe à décrire du fait de l'hétérogénéité de la matière première, de la présence d'une flore endogène en surface, de l'existence de gradients de concentrations de différents composés (eau, sel, sucres, acide lactique) entre la surface et le cœur des morceaux de viande. La Figure 18 schématise la stratégie expérimentale associée à la modélisation mise en œuvre dans ce travail afin de construire un outil d'aide à la décision pour l'optimisation du couplage DII-fermentation. Cet outil apportera des éléments de réponse sur la façon de formuler la viande par DII pour permettre une bonne conduite de l'étape de fermentation. Ainsi, ce travail s'articule autour de trois articles scientifiques (un accepté, un soumis, et un en préparation). Dans le premier article (Section III.1), une étude sur aliment réel de la fermentation après différents traitements de DII a permis de valider le couplage DII-fermentation. Dans le deuxième article (Section III.2), un modèle de la croissance en surface de *L. sakei* et en fonction de facteurs environnementaux qui traduisent l'évolution des caractéristiques de la viande soumise au couplage DII-fermentation, est construit sur un dispositif expérimental original. Dans le troisième article (Section III.3), le modèle de croissance en surface est couplé à un modèle de transfert de matière qui simule

l'évolution de la surface des morceaux de viande du fait de la DII. Le modèle global ainsi construit est utilisé pour analyser le potentiel de différents traitements de DII à permettre la croissance de *L. sakei*.

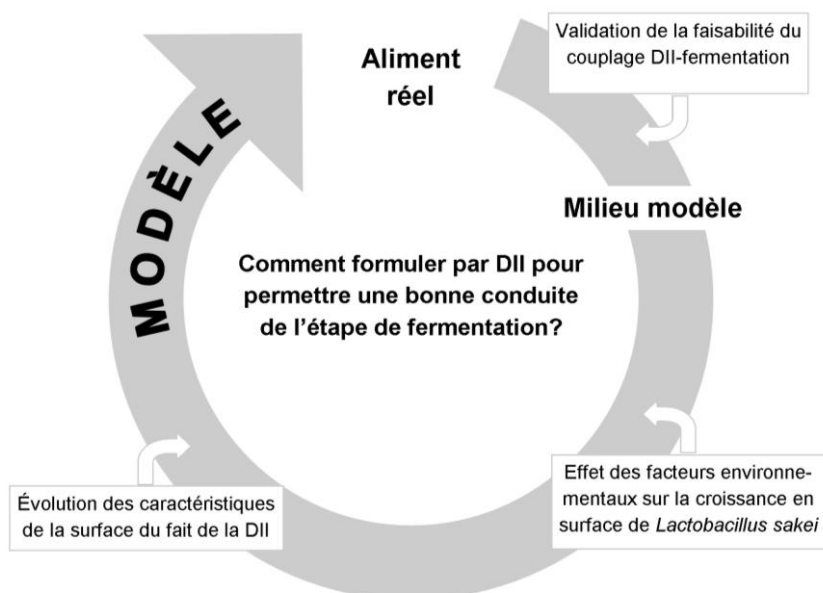


Figure 18. Stratégie de construction d'un outil d'aide à la décision pour l'optimisation du couplage de la Déshydratation-Imprégnation par Immersion à une fermentation par *Lactobacillus sakei* en surface d'une viande.

Cette discussion générale reprend les principaux résultats de ce travail, ainsi que des résultats complémentaires en effectuant une analyse critique des choix réalisés et en apportant des perspectives d'amélioration. L'ensemble de ces considérations est abordé autour de quatre volets :

- la construction d'un procédé innovant autour du couplage de la DII à une fermentation lactique de surface
- la mise au point d'un dispositif expérimental original d'étude de la croissance microbienne en surface,
- la construction d'un modèle de la croissance en surface de *L. sakei* en fonction de facteurs environnementaux liés au couplage DII-fermentation,
- l'incorporation du modèle de croissance dans l'élaboration d'un outil d'aide à la décision pour l'optimisation du couplage DII-fermentation.

IV.1. CONSTRUCTION D'UN PROCÉDÉ INNOVANT AUTOUR DU COUPLAGE DE LA DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION À UNE FERMENTATION LACTIQUE DE SURFACE

La Figure 19 présente l'enchaînement des étapes du procédé innovant étudié dans ce travail : une DII en solution ternaire eau-sel-sirop de glucose, une fermentation lactique de surface avec *L. sakei* et un séchage à l'air. L'ensemble du procédé est conduit à température ambiante.

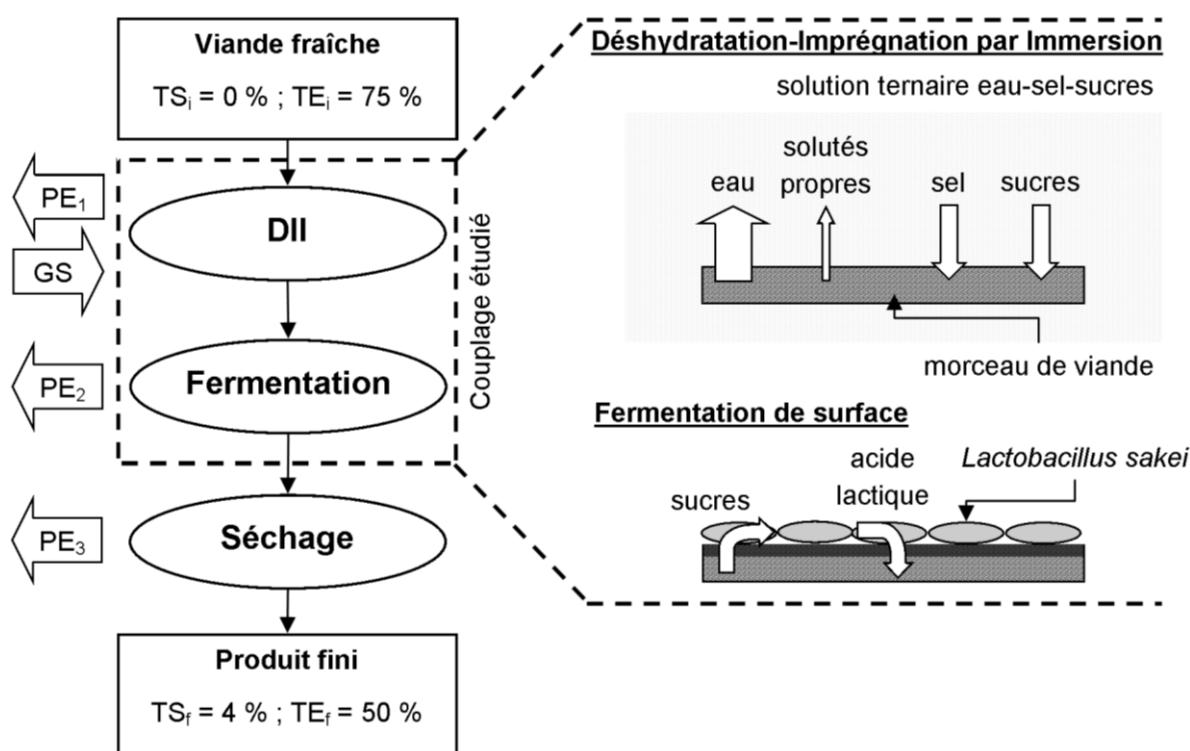


Figure 19. Enchaînement des étapes du procédé innovant de transformation de la viande en vue d'obtenir un produit carné salé-séché-fermenté stable à température ambiante et prêt-à-consommer. Teneur en eau (TE) [% (b.h.)], teneur en sel (TS) [% (b.h.)], perte en eau (PE) [% masse initiale], gain en sel (GS) [% masse initiale].

En termes de barrières, la DII diminue l'activité en eau du produit par déshydratation et par l'imprégnation en solutés osmo-dépresseurs, le sel et les sucres. Cette étape est mise en œuvre pour pré-stabiliser le produit en vue de l'étape de fermentation. La fermentation lactique des morceaux de viande est réalisée par inoculation de la surface avec *L. sakei*. Cette étape contribue à la stabilisation par la colonisation de la surface par une flore bénéfique et par la production de substances antibactériennes (acide lactique, bactériocines). L'étape finale de séchage à l'air, non

abordée dans le cadre de ce travail, sera modulée en fonction du niveau de déshydratation qu'il reste à effectuer pour aboutir à la stabilisation complète du produit. De plus, l'incorporation de sel et de sucres formule le produit en vue d'une sélection des flores au cours de l'étape de fermentation.

Les caractéristiques attendues du produit fini sont celles des produits dits « à humidité intermédiaire » détaillés dans le Tableau 1 (Section I.1.2). Il s'agit d'une teneur en sel de 4 % (b.h.) et d'une teneur en eau de 50 % (b.h.) La perte en eau et le gain en sel, déterminés en prenant en compte les caractéristiques initiales de la viande et celles du produit fini, doivent donc être respectivement de 47 % et de 2,2 % de la masse initiale. L'imprégnation en sel se fait uniquement pendant l'étape de DII. La perte en eau s'effectue au cours des étapes de DII (PE_1) et de séchage final (PE_3). À cela s'ajoute une perte en eau pouvant intervenir au cours de la fermentation (PE_2) en fonction des conditions de température et d'humidité mises en œuvre. En vue d'étudier uniquement l'impact de la DII sur l'étape de fermentation, cette dernière est conduite dans des conditions d'humidité telles que $PE_2 = 0$.

IV.2. MISE AU POINT D'UN DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ORIGINAL D'ÉTUDE DE LA CROISSANCE MICROBIENNE EN SURFACE

Afin de mieux définir les conditions opératoires de l'étape de DII qui précède la fermentation, il était nécessaire d'approfondir la connaissance sur les facteurs influençant la croissance de *L. sakei*. Cependant, étant donné la complexité de l'étude sur aliment réel du fait de l'hétérogénéité de la matière première, de la présence d'une flore endogène hétérogène et de la difficulté de formuler à souhait un morceau de viande, le choix s'est tourné vers un travail mieux maîtrisé sur aliment-modèle.

IV.2.1. HYPOTHÈSE ÉMISE : CROISSANCE EN SURFACE, UN EFFET PROTECTEUR ?

Brocklehurst *et al.* (1997) mettent en évidence que le μ_{\max} en réponse à une diminution de l'activité en eau chez *Salmonella* Typhimurium serait dans l'ordre liquide > submergé > surface. Meldrum *et al.* (2003) montrent pour *Listeria monocytogenes* que les cellules immobilisées répondent toujours moins bien aux stress environnementaux (activité en eau, pH) et que la croissance en mode immobilisé réduit les intervalles de croissance. La majorité des exemples donnés par Wilson *et al.* (2002) vont dans la même direction : croissance en liquide > solide > surface. L'exception se fait dans le cas de l'évolution de μ_{\max} pour *Staphylococcus aureus* en fonction de concentrations croissantes en saccharose en culture liquide ou immobilisée dans un gel. Lorsqu'une concentration en saccharose de 20 % (p/v) est atteinte, le μ_{\max} précédemment supérieur en liquide par rapport au gel, devient supérieur en gel. Nous postulons donc que la croissance en surface ne serait pas systématiquement défavorable et même qu'elle pourrait jouer un effet protecteur contre les stress environnementaux. Cette hypothèse n'est pas incompatible avec les connaissances sur les bio-films décrits comme des structures de protection (Shi & Zhu, 2009) et connus comme étant particulièrement problématiques en industrie étant donné leur résistance aux agents nettoyants (Kumar & Anand, 1998). Li *et al.* (2001) et Zhu *et al.* (2001) montrent pour *Streptococcus mutans* que l'acidotolérance était accrue lors de la croissance en bio-film. Kinsella *et al.* (2007) montrent que

l'adhésion de *Salmonella enterica* à la surface de la viande protège les cellules contre le stress osmotique et les basses températures. Habimana *et al.* (2010) révèlent que la présence d'un bio-film de *Acinetobacter calcoaceticus* favorise la colonisation de la surface de la viande par *Escherichia coli*. Enfin, Nielsen *et al.* (2013) expliquent qu'après un stress thermique de 30 min à 45 °C, *Salmonella* Typhimurium est plus invasive dans un état immobilisé que dans un état planctonique.

IV.2.2. CONCEPTION DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

L'étude sur aliment-modèle a été conduite sur un dispositif expérimental original qui permet d'étudier la croissance de *L. sakei* :

- sur une surface solide,
- de manière répétable,
- en l'absence d'autres flores,
- avec un milieu de culture simple, contrôlé et homogène, se rapprochant de la composition d'une viande,
- par une formulation simple du milieu permettant de découpler les effets de l'activité en eau, de la teneur en sel, du pH et de la teneur en acide lactique non-dissocié, les facteurs environnementaux qui traduisent l'évolution des caractéristiques de la viande soumise au couplage DII-fermentation.

Le dispositif conçu présente les caractéristiques suivantes :

- il est constitué d'un réservoir de milieu de culture liquide suffisamment important en volume par rapport à la surface solide pour que la disponibilité des nutriments et l'accumulation des produits de fermentation toxiques ne représentent pas un facteur limitant pour la croissance.
- une agitation garantit l'homogénéité du milieu de culture (réacteur parfaitement agité).
- le dispositif possède un système de surpression pour assurer le contact permanent entre la surface de croissance et le milieu de culture.

- il est complètement autoclavable afin de pouvoir travailler en conditions maîtrisées et répétables.

IV.2.2.1. CHOIX DU SUPPORT DE CROISSANCE

Pour le support de croissance en surface plusieurs choix ont été envisagés (Figure 20). Dans un premier temps, le menu de porc (Soussana, Thiais, France) a été testé comme étant un support d'origine animale qui se rapprocherait de la structure de la surface d'une viande. Cependant, il a été écarté en raison de sa structure trop irrégulière (présence de nervures, etc.) résultant en une porosité inconnue et variable, de la difficulté de manipulation et de découpe, et surtout en raison de sa dénaturation lors du passage à l'autoclave. Dans un deuxième temps, nous avons envisagé l'utilisation de boyaux synthétiques, plus faciles à manipuler et dont la porosité (certes non déterminée) serait plus calibrée que celle du menu du porc. Deux boyaux en collagène (Fibran, Girona, Espagne) et un en cellulose (Viskase, Darien, IL, États-Unis) ont été étudiés. Leur tenue à l'autoclave était meilleure mais une thermo-rétraction avait tout de même lieu et les boyaux synthétiques ont aussi été écartés. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec des membranes Express PLUS en polyethersulfone (PES) de 47 mm de diamètre et d'une porosité de 0,45 µm (Merck Millipore) pour les raisons suivantes :

- étant un consommable de laboratoire, l'ensemble de leurs caractéristiques est calibré,
- leur composition en PES leur confère une tenue à la chaleur supérieure à celle des autres membranes de laboratoire en esters de cellulose qui deviennent cassantes après passage à l'autoclave.

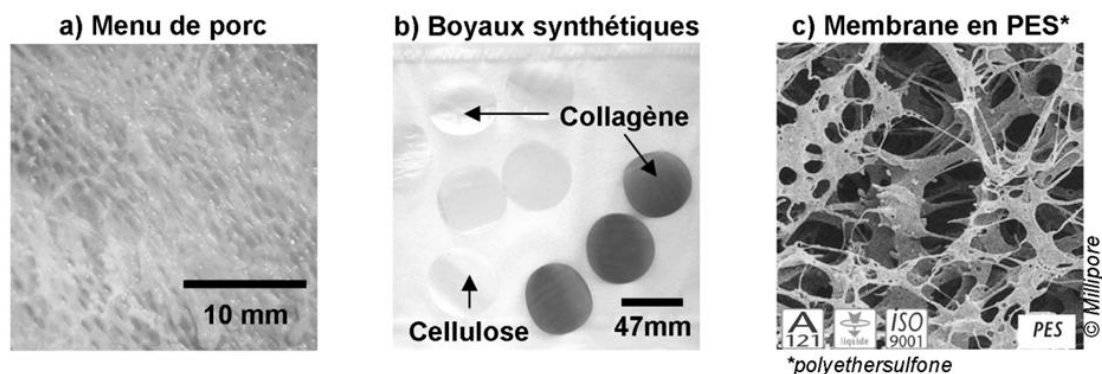


Figure 20. Différents choix de support de croissance envisagés dans la conception du dispositif expérimental : menu de porc (a), trois boyaux synthétiques (b) et membrane en polyethersulfone (c).

IV.2.2.2. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE CONTENU DANS LE DISPOSITIF

Un milieu de culture semi-synthétique modèle a été mis au point. Il s'agit du milieu MYG composé de 10 g/l d'extrait de viande, 5 g/l d'extrait de levure et 5 g/l de glucose formulé pour mimer la composition d'une viande. Ce milieu conduit à une croissance de *L. sakei* « moins bonne » que dans un milieu riche comme le bouillon MRS (Figure 21) car comme l'expliquent Devlieghere *et al.* (1998) l'utilisation de milieux de culture riches peut conduire à une surestimation de la réponse de microorganismes exigeants telles que les bactéries lactiques.

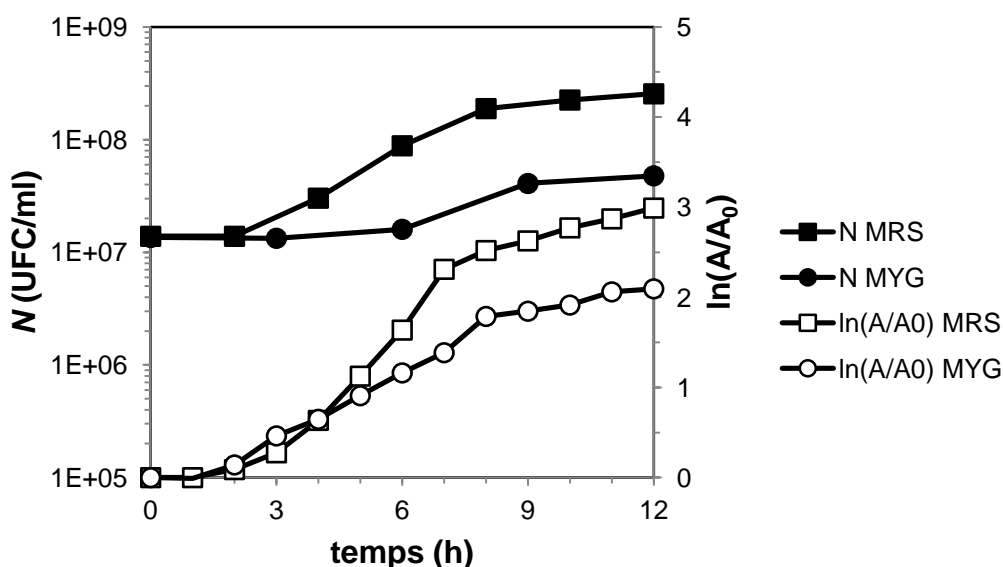


Figure 21. Évolution de la population de *Lactobacillus sakei* (N) en UFC/ml (symboles pleins) et en logarithme népérien de l'absorbance à 600 nm (symboles vides), lors de la culture à 25 °C en bouillon MRS (carrés) et en milieu MYG (ronds).

IV.2.2.3. CHOIX DES CONDITIONS DE PRÉ-CULTURE

Une série d'essais préliminaires ont été conduits en utilisant différentes combinaisons de milieux pour la pré-culture et pour le dispositif (Figure 22). Aucune différence dans la croissance en dispositif n'a été observée pour les différentes conditions.

Hüfner & Hertel (2008) observent que de meilleurs résultats sont obtenus pendant l'étape de fermentation en conditionnant les bactéries aux stress environnementaux dès la pré-culture. Il a donc été choisi de travailler en réalisant la pré-culture dans le même milieu que celui utilisé dans le dispositif (MYG) pour avoir exactement les mêmes conditions en pré-culture et lors de la croissance en dispositif. Ainsi, lorsque les conditions en dispositif varieront en fonction de la formulation du milieu de culture, la réponse de *L. sakei* sera due exclusivement à ce changement et non pas à une adaptation préalable des cellules.

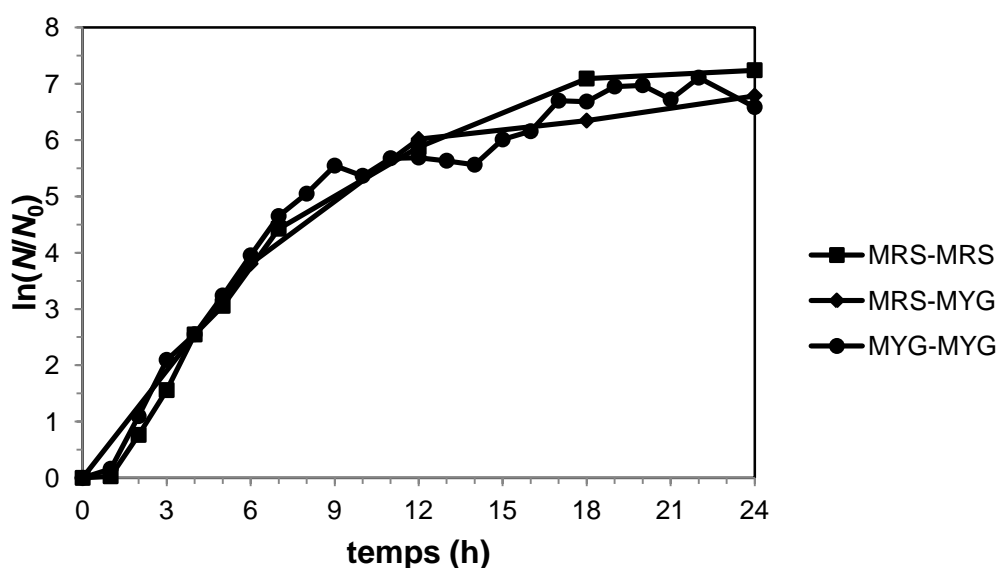


Figure 22. Évolution de la population de *Lactobacillus sakei* ($\ln(N/N_0)$ avec N [UFC/cm²]) lors de la croissance sur le dispositif, avec différentes combinaisons de milieux pour la pré-culture et le dispositif : MRS-MRS MRS en pré-culture et MRS en dispositif, MRS-MYG MRS en pré-culture et MYG en dispositif et MYG-MYG MYG en pré-culture et MYG en dispositif.

IV.2.3. VALIDATION DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

IV.2.3.1. RÉPÉTABILITÉ DE LA CROISSANCE EN SURFACE DE *LACTOBACILLUS SAKEI*
EN DISPOSITIF

Le dispositif expérimental a été validé en termes de répétabilité de la croissance de *L. sakei* du fait l'ensemble de la manipulation depuis la préparation des dispositifs jusqu'au dénombrement des populations présentes sur les membranes. La Figure 23 présente les écart-types relatifs de la population bactérienne par unité de surface (N en UFC/cm²) qui est en moyenne de 37 %. Cette valeur induit une variation de 14 % sur $\log_{10} N$ ce qui est acceptable au vu de la précision de la technique de dénombrement.

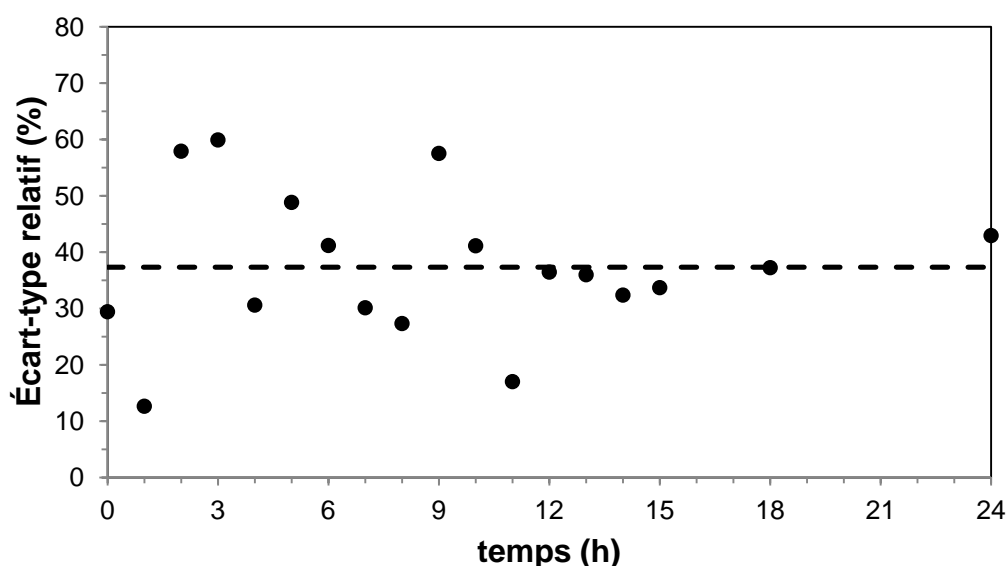


Figure 23. Écart-type relatif ($3 \leq n \leq 9$) de la mesure de la population de *Lactobacillus sakei* par unité de surface (N) [UFC/cm²] sur les échantillons issus de l'essai de référence (milieu MYG $a_w = 1,00$, pH = 5,60, sans NaCl ni LaH).

IV.2.3.2. VALIDATION DE LA NON-CONTAMINATION DU MILIEU DE CULTURE
CONTENU DANS LE DISPOSITIF

Des dénombrements sur PCA et MRS du milieu de culture de trois répétitions de l'essai de référence (milieu MYG $a_w = 1,00$, pH = 5,60, sans NaCl ni LaH) montrent des niveaux acceptablement bas aussi bien à 0 h qu'à 48 h (Tableau 9). Ces dénombrements, en combinaison

avec une appréciation visuelle des milieux de culture qui apparaissent toujours limpides, confirment qu'il n'y a pas de contamination du milieu de culture contenu dans les dispositifs.

Tableau 9. Charge microbienne [\log_{10} UFC/ml] du milieu de culture MYG contenu dans le dispositif au cours de l'essai de référence ($a_w = 1,00$, pH = 5,60, sans NaCl ni LaH).

Temps (h)	Flore aérobie mésophile totale (PCA)	Flore lactique (MRS)
0 h	0,9 (0,5)	< 10 colonies
48 h	3,0 (2,5)	2,2 (1,5)

Les résultats sont montrés sous la forme : moyenne (écart-type) avec $n = 3$ pour chaque groupe.

IV.2.3.3. VALIDATION DU FONCTIONNEMENT DU DISPOSITIF EN CONDITIONS NON-LIMITANTES

Le Tableau 10 présente l'évolution des caractéristiques physico-chimiques du milieu de culture MYG contenu dans le dispositif au cours de l'essai de référence. À 0 h, le pH et la concentration en D-glucose sont en accord avec les valeurs cibles avant autoclavage de 5,60 et 5 g/l respectivement, les concentrations en acides D- et L-lactique sont négligeables. À 12 h, toutes les valeurs sont non-significativement différentes des valeurs à 0 h. À 24 h, seuls le pH et la concentration en acide L-lactique ont évolué significativement en atteignant 5,02 et 0,37 g/l respectivement.

Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques du milieu de culture MYG contenu dans le dispositif au cours de l'essai de référence ($a_w = 1,00$, pH = 5,60, sans NaCl ni LaH).

Temps (h)	pH	D-glucose	Concentration (g/l) Acide D-lactique	Acide L-lactique
0	5,61 (0,03) ^a	4,348 (0,281) ^a	< 0,025	0,039 (0,017) ^a
12	5,63 (0,07) ^a	4,701 (0,291) ^a	< 0,025	0,071 (0,025) ^a
24	5,02 (0,07) ^b	4,243 (0,017) ^a	< 0,025	0,375 (0,017) ^a

Les résultats sont montrés sous la forme : moyenne (écart-type) avec $n = 3$ pour chaque groupe. Dans chaque colonne les valeurs portant des indices différents sont significativement différentes ($P < 0,05$).

La Figure 2 de l'article 2 (Section III.2) montre une induction de la phase stationnaire de croissance autour de 9-10 h d'incubation des dispositifs. Ceci en combinaison avec les données du Tableau 10 et l'hypothèse que les phénomènes de diffusion à travers la membrane sont négligeables vu son épaisseur ($\approx 140 \mu\text{m}$), suggère que la transition de la phase exponentielle vers la phase stationnaire de croissance n'était due ni à l'accumulation de produits du

métabolisme toxiques (acide lactique) ni à l'épuisement du substrat (glucose) mais plutôt à la saturation de la membrane.

L'estimation des paramètres du modèle de croissance en surface de *L. sakei* s'est donc effectuée en conditions non-limitantes pour l'essai de référence mais aussi pour tous les autres essais du plan d'expériences (Tableau 7 Section III.2.3.2). Ceci est mis en évidence par la non-variation du pH au cours des essais (Figure 24), considérée comme un indicateur du bon fonctionnement du dispositif en conditions non-limitantes.

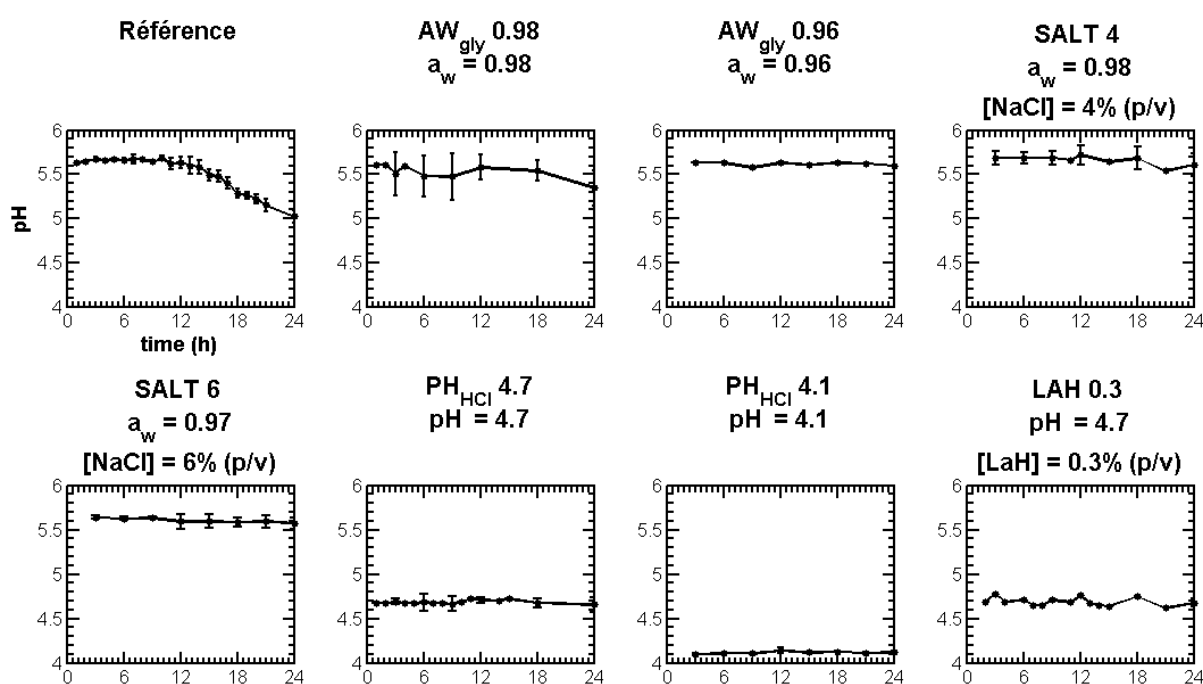


Figure 24. Évolution du pH du milieu de culture MYG contenu dans le dispositif au cours de 24 h d'incubation pour les essais du plan d'expériences (Tableau 7 Section III.2.3.2). Lorsque présentes, les barres d'erreur correspondent à l'écart-type avec $n \geq 3$.

IV.3. MODÉLISATION DE LA CROISSANCE EN SURFACE DE *LACTOBACILLUS SAKEI*

IV.3.1. HYPOTHÈSE ÉMISE : ÉTUDE D'UNE FLORE BÉNÉFIQUE, UNE PROBLÉMATIQUE DIFFÉRENTE ?

La revue de Marks (2008) souligne bien l'intérêt d'incorporer des modèles de croissance microbienne dans des situations réelles de procédés de fabrication. Ceci est en accord avec la démarche suivie dans ce travail. Cependant, cet objectif est argumenté dans la revue uniquement dans l'optique de lutter contre les flores d'altération et les pathogènes et aucune mention n'est faite concernant l'influence des procédés de fabrication sur les flores bénéfiques. Leroy *et al.* (2002) parlent d'une nouvelle approche dans la microbiologie prévisionnelle en ce qui concerne l'étude des flores bénéfiques telles que les bactéries lactiques. Analyser la croissance d'une flore bénéfique en fonction des conditions du procédé présente en effet un intérêt technologique mais nécessite de prendre en compte certaines différences dans la modélisation de la croissance par rapport à celle de flores négatives.

Pour les flores négatives, les prédictions dites « fail-safe », c'est dire prévoyant une croissance avec un μ_{\max} supérieur à celui obtenu réellement, ne sont pas problématiques car elles assurent bien la sécurité sanitaire du produit, ce qui est le but final. Pour une flore bénéfique, le but final est que cette flore s'implante de façon majoritaire sur/dans le produit. Le produit est alors protégé car les flores négatives ne peuvent pas s'y installer (bio-protection). Dans ce cas, une prédiction de croissance supérieure à celle obtenue réellement n'est pas avantageuse.

Il est possible d'appliquer la même logique à la prédiction de λ . Pour une flore négative le fait de se placer dans la « pire des situations » de $\lambda = 0$ est aussi une situation « fail-safe » qui assure la sécurité sanitaire du produit. Pour une flore bénéfique une prédiction efficace de λ est fondamentale pour mettre en œuvre des conditions qui assurent le bon développement de cette flore au cours du procédé.

Le niveau de charge initial est aussi un facteur important dans la prédiction de la croissance selon qu'il concerne des flores bénéfiques ou des flores négatives. En effet, une flore bénéfique

installée en grands nombres sur un aliment serait en mesure de mieux répondre à un stress environnemental (avec un λ plus faible) qu'une flore négative tout simplement par le niveau de charge initial : plus il y a de cellules et plus la probabilité d'adaptation aux conditions environnementales est élevée (Francois *et al.*, 2005). C'est pourquoi une étude des interactions entre flores devra utiliser des niveaux d'inoculation réalistes soit : des niveaux élevés de l'ordre de 10^6 UFC/g pour *L. sakei*, et des niveaux plus faible de l'ordre de 10^2 UFC/g pour les flores pathogènes ou d'altération.

IV.3.2. CONSTRUCTION DU MODÈLE

IV.3.2.1. CHOIX DU MODÈLE PRIMAIRE

Le choix du modèle primaire s'est fait en comparant le modèle de Rosso *et al.* (1996), celui de Baranyi & Roberts (1994) et celui de Huang (2008). Le modèle de Rosso *et al.* (1996) a été écarté car sa structure en deux équations avec λ comme critère de passage d'une équation à l'autre n'était pas compatible avec notre problématique de chercher à prédire λ . Entre le modèle de Baranyi & Roberts (1994) et celui de Huang (2008), le modèle de Baranyi & Roberts (1994) a été écarté en raison de sa fonction d'ajustement qui ne donnait pas une transition assez abrupte entre la phase de latence et la phase exponentielle (Figure 25).

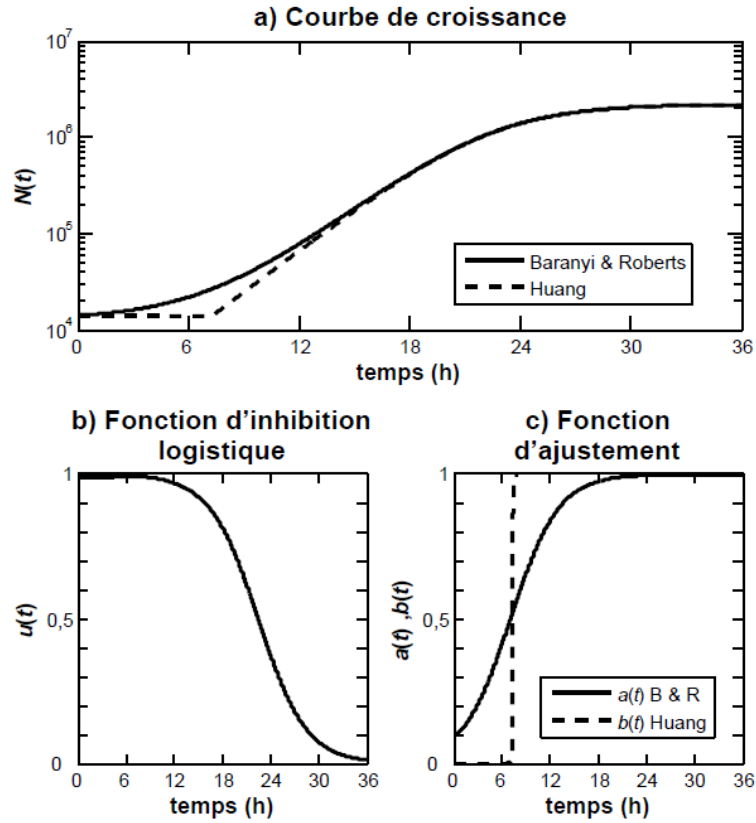


Figure 25. Comparaison des modèles primaires de Baranyi & Roberts (1994) et de Huang (2008) avec $N_0 = 1 \cdot 10^4$ UFC, $N_{\max} = 2 \cdot 10^6$ UFC, $\lambda = 7,3$ h et $\mu_{\max} = 0,3$ h⁻¹, selon une représentation inspirée de Van Impe *et al.* (2005). Courbe de croissance (a), fonction d'inhibition logistique $u(t)$ commune aux deux modèles (b) et fonctions d'ajustement $a(t)$ et $b(t)$ pour le modèle de Baranyi & Roberts (1994) et le modèle de Huang (2008) respectivement (c).

Le modèle de Huang (2008) a donc été choisi. Sa fonction d'ajustement utilise un paramètre de courbure (α) et la durée de la phase de latence (λ). L'intérêt est premièrement de donner λ de manière explicite plutôt qu'au travers du paramètre q_0 du modèle de Baranyi & Roberts (1994). En effet, ce paramètre q_0 est moins intuitif car non visible à proprement parler sur une courbe de croissance, et sa définition suppose un lien de proportionnalité entre λ et μ_{\max} . Deuxièmement, en ajustant la valeur du paramètre α , il est possible de moduler la courbure de la transition entre phase de latence et phase exponentielle en la rendant plus ou moins abrupte. Ceci permet d'obtenir une courbe de croissance dans laquelle la phase de latence est clairement définie plutôt que la forme trop lissée donnée par le modèle de Baranyi & Roberts (1994) (Figure 25). Cependant, l'utilisation du paramètre α peut être critiquée au vu des remarques de Van Impe *et al.* (1995) sur les conditions des modèles primaires sous forme différentielle : α est un

paramètre purement empirique qui doit être fixé *a priori* étant donné sa mauvaise identifiabilité qui est due au fait qu' α est contenu dans la fonction exponentielle (Huang, 2008).

IV.3.2.2. UTILISATION DU GAMMA-CONCEPT POUR DÉCRIRE L'INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Le γ -concept (Zwietering *et al.*, 1996) est utilisé pour décrire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres du modèle primaire, λ et μ_{\max} . Cette approche permet de décrire simplement l'influence de plusieurs facteurs environnementaux avec un nombre limité de paramètres et permet une complexification progressive.

IV.3.2.3. PARAMÈTRES LAMBDA ET μ_{\max} : TOUJOURS PROPORTIONNELS ?

Le choix a été fait dans ce travail de décrire indépendamment les paramètres λ et μ_{\max} avec le γ -concept. En effet, la relation de proportionnalité entre ces paramètres suggérée par Baranyi & Roberts (1994) pour la définition de q_0 , le paramètre « état physiologique des cellules » qui décrit la phase de latence et la transition vers la phase exponentielle, ne se vérifie pas dans le cadre de notre étude. Ceci est apparent dans la représentation inspirée de Vadasz & Vadasz (2007) de λ en fonction de μ_{\max} sur une double échelle logarithmique (Figure 26) en utilisant nos données.

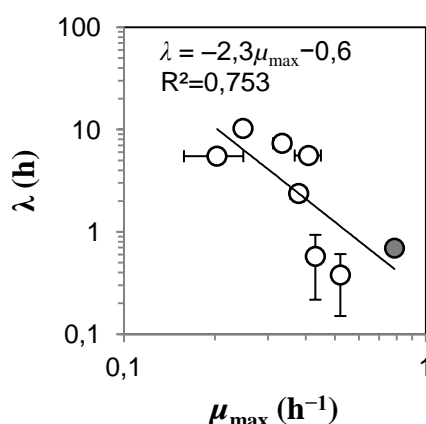


Figure 26. Représentation inspirée de Vadasz & Vadasz (2007) de λ en fonction de μ_{\max} pour les essais en dispositif contenant du milieu de culture MYG. Données issues du Tableau 1 §3.2. « Primary model performance » des résultats et discussion de l'article 2 (Section III.2). L'essai de référence ($a_w = 1,00$, pH = 5,60, sans NaCl ni LaH) apparaît comme un rond gris. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95 %.

Les points sont effectivement distribués le long d'une droite mais la relation de proportionnalité est très incertaine. Robinson *et al.* (1998) observent que pour *Listeria monocytogenes* la relation linéaire entre λ et le temps de génération ($t_g = \ln(2)/\mu_{\max}$) qui se vérifie lorsque les cellules sont exposées à un stress thermique, se dégrade lorsque d'autres stress (pH, sel) sont appliqués. Ceci suggère que l'influence de l'environnement sur λ est plus complexe que sur μ_{\max} et explique la difficulté de prédire la durée de la phase de latence remarquée par tant d'auteurs (Swinnen *et al.*, 2004).

Afin d'améliorer la qualité de la prédiction de λ , des travaux futurs pourront utiliser la notion de « travail à faire » pour sortir de la phase latence :

- la quantité de travail à faire est fonction de l'environnement et les composés (par exemple osmo-protecteurs) qui y sont présents (Zhou *et al.*, 2011),
- la vitesse à laquelle se fait le travail dépend de l'état physiologique des cellules avant l'introduction du stress (Muñoz-Cuevas *et al.*, 2010),
- le travail à faire dépend à la fois de l'amplitude du changement de l'environnement précédent par rapport à l'environnement actuel et de la proximité du niveau de stress au niveau limite de croissance (Mellefont *et al.*, 2003).

Outre cette vision plus mécanistique de la phase de latence, la voie pour améliorer la prédiction de λ est celle d'étudier les cellules de manière individuelle (Dens *et al.*, 2005a; Dens *et al.*, 2005b; Pin & Baranyi, 2006; Verhulst *et al.*, 2011). Alors qu'une cellule qui sort de phase de latence se multiplie immédiatement à sa vitesse μ_{\max} (Francois *et al.*, 2005), la notion de distribution de population qui fait que toutes les cellules ne sortent pas de la phase de latence en même temps, explique la transition progressive d'une vitesse de croissance nulle à la vitesse μ_{\max} . Dans ce même raisonnement, McKellar (1997) et Zhou *et al.* (2011) divisent la population initiale en deux compartiments en supposant qu'une partie des cellules réussira à s'adapter à l'environnement et commencera se diviser, et l'autre non.

Cette vision prend tout son sens dans la comparaison de la croissance d'une flore bénéfique (population initiale élevée) avec à la croissance de flores pathogènes (population initiale faible) (Section IV.3.1).

IV.3.2.4. N_{MAX} : UN PARAMÈTRE PUREMENT EMPIRIQUE ?

Dans la procédure d'estimation des paramètres du modèle primaire, N_{max} est identifié au même titre que le sont λ et μ_{max} . Pourquoi alors ne pas avoir construit un modèle pour décrire l'influence des facteurs environnementaux sur N_{max} dans le même esprit que ceux construits pour λ et μ_{max} ?

Le paramètre N_{max} est un héritage de la fonction d'inhibition logistique. Il est, selon Van Impe *et al.* (2005), purement empirique car il induit l'entrée en phase stationnaire mais ne contient pas la raison pour laquelle la phase stationnaire est induite. En réponse à cette insuffisance, les auteurs proposent un nouveau modèle. Ce modèle garde la structure différentielle du modèle de Baranyi & Roberts (1994) mais propose une vision plus mécanistique de l'entrée en phase stationnaire. Ainsi, l'entrée en phase stationnaire est décrite par une fonction d'inhibition dépendante soit de l'épuisement du substrat (S-model) soit de la production d'un métabolite auto-inhibiteur tel que l'acide lactique (P-model).

Dans notre étude, il apparaît que du fait de la structure de la forme différentielle du modèle de Huang (2008), et de l'incorporation du γ -concept sur μ_{max} , l'induction de la phase stationnaire est pilotée, à la fois, par la fonction d'inhibition logistique qui contient N_{max} , et par μ_{max} . En effet, l'entrée en phase stationnaire peut se produire avant d'atteindre N_{max} si μ_{max} est annulé, par le biais du γ -concept, en raison de conditions environnementales défavorables, notamment une concentration trop importante en acide lactique. Autrement, l'entrée en phase stationnaire a lieu lorsque N_{max} est effectivement atteint.

Le paramètre N_{max} contient l'information de la capacité maximale du milieu, non pas en termes de ressources nutritionnelles, mais en termes de saturation de la surface. Ceci est illustré dans ce travail par l'essai de référence en milieu modèle (milieu MYG sans ajout d'ingrédient

supplémentaire). Dans cet essai, l'entrée en phase stationnaire a lieu lorsque la population atteint environ 10^6 UFC/cm² alors que le glucose est en excès et que l'acide lactique est présent en quantités négligeables. Ainsi, dans le cas de la croissance sur un support solide, le paramètre N_{\max} a tout son sens car il contient l'information de la limitation spatiale, et peut ne pas être considéré comme un paramètre purement empirique.

IV.3.3. INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

IV.3.3.1. FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ÉTUDIÉS

Les facteurs environnementaux pouvant influencer la croissance en surface de *L. sakei* et pertinents dans le cadre du couplage DII-fermentation sont : l'activité en eau et la teneur en sel modifiées par DII, le pH et la teneur en acide lactique modifiés par le métabolisme fermentaire.

Au cours du traitement de DII, l'utilisation d'une solution ternaire eau-sel-sucre facilite la perte en eau tout en limitant le gain en sel grâce à l'imprégnation des sucres (Collignan & Raoult-Wack, 1994; Santchurn *et al.*, 2007). De ce fait, l'activité en eau qui en résulte n'est pas expliquée exclusivement par l'imprégnation en sel et la perte en eau mais aussi par la présence d'autres solutés osmo-dépresseurs, les sucres. De plus, des études ont souligné l'existence d'une toxicité de la molécule sel outre sa propriété d'osmo-dépresseur (Tempest & Meers, 1968; Neysens *et al.*, 2003; Theys *et al.*, 2010). C'est pour ces raisons que l'activité en eau et la teneur en sel sont étudiées séparément.

Au cours de l'étape de fermentation, la croissance en surface de *L. sakei* produit de l'acide lactique. Étant donné que le métabolisme fermentaire est un processus qui s'auto-inhibe, si l'acide lactique s'accumule à la surface autour des cellules bactériennes, la croissance peut être affectée par la diminution du pH environnant mais aussi par la toxicité spécifique de la forme non-dissociée de l'acide lactique (LaH). Le pH et l'acide lactique sont donc étudiés séparément et vu que la toxicité de l'acide lactique est due à la forme non-dissociée c'est la teneur en LaH et non pas en acide lactique total qui a été choisie comme facteur.

Cependant, nous nous sommes heurtés au fait que ces 4 facteurs étaient liés 2 à 2, à savoir l'activité en eau et le NaCl d'une part, et le pH et l'acide lactique non dissocié d'autre part. Il a donc fallu trouver des solutions pour découpler les effets : abaisser l'activité en eau à la même valeur avec du glycérol et avec du NaCl, et étudier l'influence de LaH à pH 4,70 plutôt qu'à la valeur de référence de 5,60, trop éloignée du pKa de l'acide lactique, à laquelle la forme non-dissociée n'est donc quasiment pas présente.

IV.3.3.2. LE GLUCOSE : EST-IL UN FACTEUR D'ÉTUDE PERTINENT ?

Lors de l'étude des facteurs environnementaux sur la croissance de *L. sakei*, il a été choisi de se mettre en condition non-limitante de substrat, le glucose et donc de ne pas étudier le glucose comme un facteur. Ce choix était justifié car il s'est avéré que les besoins en glucose pour la croissance de *L. sakei* sont infimes ce qui est confirmé par :

- les dosages de glucose présentés dans le Tableau 10 qui ne montrent pas de diminution significative de la concentration en glucose du milieu de culture,
- des essais préliminaires dans lesquels la concentration en glucose du milieu de culture a été diminuée jusqu'à 0,1g/l sans impact sur la croissance,
- Nicolai *et al.* (1993) qui stipulent que l'épuisement de substrat, si important dans les fermentations en fermenteur n'est pas un facteur d'importance sur l'aliment réel.

Ainsi, les besoins en glucose pour la croissance de *L. sakei* seraient pourvus par une faible imprégnation par DII voire même dans la viande fraîche.

L'intérêt du glucose, et des autres sucres imprégnés par DII, réside donc plutôt dans la perte en eau et la diminution de l'activité qu'ils provoquent lors d'un traitement de DII en solution ternaire. Ceci est apparent dans les travaux de Santchurn (2009). Lors d'un traitement en solution binaire eau-sel, la perte en eau ne dépasse jamais 2,5 % alors qu'elle atteint rapidement 10 % dans une solution ternaire eau-sel-sirop de glucose conduisant ainsi à une diminution de l'activité en eau de 1 à 0,97.

IV.3.4. CONSTRUCTION D'UNE BASE DE DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Dans le cadre de ce travail, l'acquisition des données dans l'étude de la croissance de *L. sakei* en milieu modèle a été une étape clé. Il s'agissait de décrire l'influence de l'activité en eau, de la teneur en sel (modifiées par la DII), du pH et de la teneur en acide lactique non-dissocié (modifiés au cours de l'étape de fermentation) en formulant le milieu de culture. Cependant, nous nous sommes heurtés au fait que nous ne savions pas au début quelles allures allaient avoir les courbes de croissance, ni quelle serait la fenêtre d'observation (6 h, 24 h, 1 semaine ?). De plus, il a fallu déterminer la fréquence d'échantillonnage pour bien caractériser les trois phases de la courbe de croissance et les différentes formulations du milieu de culture. Enfin, les limites de croissance n'étaient pas connues *a priori* mais déterminées par tâtonnements successifs.

Ainsi, l'acquisition des données de la croissance de *L. sakei* a demandé un effort expérimental important (Annexe 1) mais constitue une base solide qui a été utilisée de manière satisfaisante dans la construction du modèle de croissance et qui peut être enrichie en réalisant de nouvelles cinétiques, notamment autour des bornes des intervalles de croissance.

IV.3.5. INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE MÉTABOLISME DE *LACTOBACILLUS SAKEI* : UNE LIMITE DU DISPOSITIF

La démarche expérimentale telle qu'elle a été conduite, a mis en évidence l'effet des facteurs environnementaux uniquement sur la croissance de *L. sakei*. L'effet sur le métabolisme n'a pas été étudié. Le suivi du pH du milieu de culture au cours des essais du plan d'expériences (Tableau 7 Section III.2.3.2), a montré une diminution du pH de 5,61 (0,03) à 0 h, à 5,10 (0,07) à 24 h, uniquement pour l'essai de référence alors que pour tous les autres essais le pH reste constant à la valeur initiale (Figure 24 Section IV.3.5). Cette non-variation du pH semblerait montrer que l'apparition d'un stress environnemental modifie, non seulement la croissance de *L. sakei*, mais aussi son métabolisme de manière générale. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudra conduire une analyse plus approfondie des composés consommés (glucose, arginine, etc.) et produits (acide lactique, acétique, etc.). Ceci permettrait de comprendre quelles voies

métaboliques étaient empruntées et de mettre en évidence des relations entre un stress environnemental et l'orientation vers une voie métabolique par rapport à une autre. Des études de ce type ont été conduites en milieu liquide par Blickstad (1984) et Catte *et al.* (1999) qui évaluent la production d'acide en fonction de la formulation du milieu en activité en eau et en NaCl notamment. C'est dans ce cadre de modification du métabolisme suite à un stress environnemental que le glucose devient un facteur pertinent.

Cependant, cette analyse n'est pas envisageable sur le dispositif expérimental présenté dans ce travail. En effet, du fait de l'important volume du réservoir de milieu de culture (milieu infini) par rapport à la croissance des bactéries sur la membrane, les substrats et produits du métabolisme ne peuvent être dosés en raison de l'important facteur de dilution.

IV.4. ÉLABORATION D'UN OUTIL D'AIDE À LA DÉCISION POUR L'OPTIMISATION DU COUPLAGE DII-FERMENTATION

IV.4.1. STRUCTURE DU MODÈLE GLOBAL : IMPACT DES TRANSFERTS DE MATIÈRE SUR LA CROISSANCE DE *LACTOBACILLUS SAKAI* À LA SURFACE D'UNE VIANDE PRÉ-TRAITÉE PAR DÉSHYDRATATION-IMPRÉGNATION PAR IMMERSION

La Figure 27, inspirée de Wilson *et al.* (2002), décrit la structure du modèle de croissance de *L. sakei* à la surface d'une viande pré-traitée par DII. Le modèle global incorpore le modèle de croissance mis au point sur dispositif expérimental (Section III.2) et un modèle de transfert de matière. Dans l'article 3 (Section III.3), ce modèle simule la variation de l'activité en eau et de la teneur en sel au sein et en surface des morceaux de viande au cours et après le traitement de DII. Pendant la DII, la viande s'appauvrit en eau et s'enrichit en solutés puis, une fois la viande sortie de la solution d'immersion, l'eau et les solutés s'équilibrent entre la surface et le cœur.

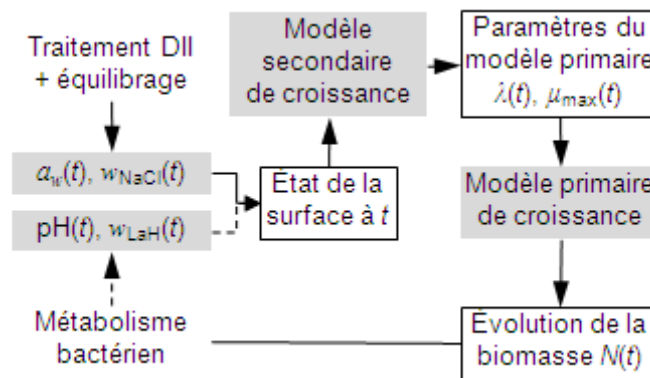


Figure 27. Représentation inspirée de Wilson *et al.* (2002) du modèle global de croissance de *Lactobacillus sakei* à la surface d'une viande pré-traitée par Déshydratation-Imprégnation par Immersion. Activité en eau ($a_w(t)$), fraction massique de NaCl ($w_{NaCl}(t)$), pH ($pH(t)$) et fraction massique d'acide lactique non-dissocié ($w_{LaH}(t)$). Paramètres du modèle primaire : durée de la phase de latence ($\lambda(t)$) et vitesse spécifique de croissance maximale ($\mu_{max}(t)$). Nombre de cellules à la surface ($N(t)$).

IV.4.2. PREMIERS RÉSULTATS : CONDITIONS DE DII COMPATIBLES AVEC LE COUPLAGE DII-FERMENTATION

Dans l'article 1 (Section III.1), l'impact de la DII sur la fermentation est étudié au travers de trois traitements de DII conçus pour induire le même gain en sel de 2,2 % et des pertes en eau croissantes. Ils sont nommés DII-20, DII-30 et DII-40 du fait des pertes en eau qu'ils induisent puis renommés A, B et C respectivement (Article 3 Section III.3).

Les données expérimentales (Article 1, Section III.1) et la simulation (Article 3 III.3) montrent que la fermentation lactique est possible après un traitement de DII A (5 h d'immersion, NaCl 100 g/kg d'eau, sirop de glucose 950 g/kg). Dans les traitements B et C, en raison de la contrainte d'un même gain en sel pour des pertes en eau croissantes, les temps d'immersion sont longs (18 h et 30 h respectivement) et mènent à un développement non-maîtrisé de la flore endogène de la viande. Nous concluons qu'il faut s'orienter vers des traitements de DII avec des temps d'immersion courts et des solutions d'immersion présentant des concentrations élevées en NaCl. Cette conclusion est renforcée par l'utilisation du modèle global (Article 3) qui indique qu'une croissance de *L. sakei* pourrait avoir lieu après un traitement de DII D1 (1 h d'immersion, NaCl 175 g/kg d'eau, sirop de glucose 950 g/kg).

Enfin, le modèle global apporte une information sur le meilleur moment pour inoculer la surface de la viande avec *L. sakei*. Les filets issus de la DII A ont subi un équilibrage de 18 h avant d'être inoculés. Or le modèle montre que les profils d'activité en eau et de sel varient très peu après les cinq premières heures d'équilibrage. Il serait donc possible de réduire la période d'équilibrage sans impacter négativement la poursuite de l'étape de fermentation et en allant dans le sens de raccourcir le temps de traitement écoulé avant l'inoculation avec *L. sakei*. Toujours dans la même optique, il serait intéressant d'évaluer la possibilité d'inoculer directement la viande après DII.

IV.4.3. PERSPECTIVES D'AMÉLIORATION : INFLUENCE DE L'ACIDE LACTIQUE

Le modèle de croissance de *L. sakei* en milieu modèle (Article 2 Section III.2) prévoit de prendre en compte les effets du pH et de l'acide lactique non-dissocié décrivant ainsi la propriété auto-inhibitrice de la fermentation lactique. Cependant ces effets n'ont pas été pris en compte dans le modèle global tel qu'il est développé dans l'article 3 (Section III.3). Pour les prendre en compte, il faudrait dans un premier temps déterminer la production d'acide lactique par *L. sakei* en tenant compte de la décomposition de cette production en deux composantes proposée par Luedeking & Piret (2000) : celle destinée à obtenir de l'énergie pour la croissance (et donc liée à μ_{\max}) et celle qui n'est pas liée à la croissance qui se fait comme une activité métabolique régulière. Pour déterminer cette production, une solution serait de passer en situation limitante sur le dispositif expérimental en fixant le milieu de culture avec de la gélose ou en travaillant sur un volume de milieu nutritif plus faible (par opposition au milieu infini utilisé dans cette étude). En utilisant les modèles de Vereecken & Van Impe (2002), il est possible de construire des relations entre l'acide lactique total et l'acide lactique non-dissocié et entre l'acide lactique non-dissocié et le pH qui sont spécifiques à un milieu donné. La Figure 28 présente ces relations pour la viande de bœuf, avec des données issues de titrations réalisées selon le protocole de Goli (2012).

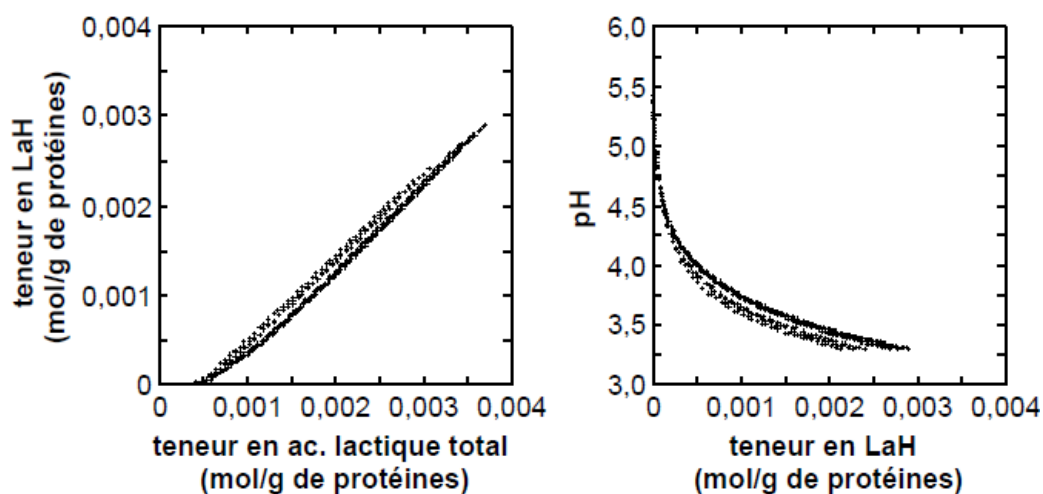


Figure 28. Relations entre le pH, l'acide lactique total et l'acide lactique non-dissocié dans la viande de bœuf considérée à 0,25 de fraction massique en protéines. Données issues de titrations de broyats de viande avec de l'acide lactique à 0,215 mol/l réalisées selon le protocole de Goli (2012).

Une fois la production d'acide lactique à la surface connue, le modèle de transfert de matière peut être amélioré en considérant les coefficients de diffusion croisés du NaCl et de l'acide lactique. Gerla & Rubiolo (2003) ont travaillé sur le saumurage du fromage et ont montré qu'alors que la diffusion du NaCl a lieu du fait de son propre gradient, la diffusion de l'acide lactique depuis le fromage vers la saumure est accrue du fait de la diffusion du NaCl dans le sens opposé, depuis la saumure vers le fromage. Dans notre cas, le NaCl et l'acide lactique résultant de l'équilibrage après DII et du métabolisme fermentaire respectivement, diffusent tous les deux dans le même sens depuis la surface vers le cœur de la viande. Si les comportements mis en évidence par Gerla & Rubiolo (2003) s'appliquent ici, cela impliquerait que la diffusion de l'acide lactique serait freinée par la diffusion du NaCl allant dans le même sens. Ceci pourrait entraîner une accumulation de l'acide lactique à la surface et induire un arrêt prématuré de la croissance de *L. sakei*.

Enfin, dans le cadre de ce travail, l'étape de fermentation a été conduite dans des conditions d'humidité élevée pour éviter le séchage des filets pendant l'incubation (Section IV.1). Cependant, en conditions réelles, un séchage du produit au cours de l'étape de fermentation est tout à fait envisageable. Le modèle proposé par Lebert *et al.* (2007b) pour la croissance de *Listeria innocua* à la surface d'une gélose en fonction de l'activité en eau modifiée par le séchage des blocs de gélose pourra être utilisé.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'objectif technologique de concevoir un procédé innovant de transformation de la viande basé sur la théorie des barrières et construit autour du couplage d'une étape de DII avec une fermentation lactique de surface. Ce procédé doit permettre l'obtention, à partir de morceaux de viande de petite taille, d'un produit carné salé-séché-fermenté stable à température ambiante et prêt-à-consommer. La réussite du procédé est conditionnée par l'efficacité du couplage DII-fermentation.

Une stratégie expérimentale progressive associée à la modélisation a permis d'aboutir à une meilleure compréhension de la situation réelle complexe qu'était la croissance d'une flore bénéfique, *L. sakei*, à la surface d'une viande traitée par DII.

Le travail a été initié en validant la faisabilité du couplage DII-fermentation sur aliment réel. Des filets de viande issus d'un traitement de DII de 5 h d'immersion dans une solution à 100 g/kg d'eau de NaCl et 950 g/kg d'eau de sirop de glucose puis inoculés en surface avec *L. sakei*, montraient des signes de fermentation après 24 h d'incubation à 25 °C. Il s'agissait d'une augmentation de la teneur en acide D-lactique de 0,09 à 0,22 g/100g (b.h.) et d'une population élevée de *L. sakei*.

Par la suite, du fait de la complexité de l'étude sur aliment réel, le travail s'est poursuivi en milieu modèle avec la mise au point d'un dispositif expérimental original. Ce dispositif permet d'étudier la croissance microbienne sur une surface en conditions maîtrisées et permet de découpler facilement les effets de différents facteurs environnementaux. Il s'agissait, dans le cadre de ce travail, de facteurs pertinents dans le cadre du couplage DII-fermentation : l'activité en eau et de la teneur en sel modifiées par DII, et du pH et de la teneur en acide lactique non-dissocié modifiés par le métabolisme fermentaire. Des données génériques sur la croissance de *L. sakei* en surface en fonction de ces facteurs ont été obtenues. Premièrement, les limites de croissance en fonction de chaque facteur ont été déterminées ($a_w = 0,94$, $[\text{NaCl}] = 7 \%$ (p/v), $\text{pH} = 4,00$ et $[\text{LaH}] = 0,5 \%$ (p/v)). Deuxièmement, l'effet de chaque facteur sur l'ensemble de

l'intervalle de croissance a été mis en évidence à la fois sur la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) et sur la durée de la phase de latence (λ) par l'intermédiaire d'un modèle de croissance composé du modèle primaire de Huang (2008) et du γ -concept.

Le travail s'est finalisé par l'élaboration d'un outil d'aide à la décision pour l'optimisation du couplage DII-fermentation : il incorpore le modèle de croissance de *L. sakei* mis au point sur dispositif expérimental et un modèle de transfert de matière qui simule la variation de l'activité en eau et de la teneur en sel du fait de la DII. Les simulations réalisées à l'aide de cet outil confirment la réussite de l'étape de fermentation suite à la DII 5 h d'immersion, NaCl 100 g/kg d'eau et sirop de glucose 950 g/kg d'eau et suggèrent qu'une DII plus courte (1 h d'immersion) dans une solution d'immersion plus concentrée en NaCl (175 g/kg d'eau) serait également favorable pour l'étape de fermentation.

À la question de comment formuler par DII afin de permettre une bonne conduite de l'étape de fermentation, nous apposons la question suivante : quelles sont les conditions pour que *L. sakei* s'implante à la surface d'une viande pré-traitée par DII ? Nous y apportons les réponses suivantes :

- La bactérie doit être présente avec une charge initiale importante voisine de 10^6 UFC/g. Ceci est pour l'instant mis en œuvre en inoculant avec un starter commercial. Cependant, *L. sakei* faisant partie de la flore endogène de la viande, une fermentation spontanée serait envisageable pourvu que la DII sélectionne les flores endogènes bénéfiques.
- La viande doit présenter une charge microbienne totale basse avant inoculation. En effet, si la surface du produit est déjà colonisée par d'autres flores, *L. sakei* s'implantera plus difficilement comme la flore majoritaire.
- *L. sakei* doit se développer rapidement (λ petit) et à une vitesse importante (μ_{\max} grand). C'est ici que ce travail apporte d'importants éléments de réponse. En effet, le modèle de croissance en surface de *L. sakei* couplé à celui de l'évolution de la surface suite au traitement de DII ont permis de définir les conditions de DII qui sont le plus favorables au développement de *L. sakei* aux dépens d'autres flores.

Ainsi, dans un contexte tropical ou des pays du Sud où l'altération de la viande est accrue, nos résultats montrent que la mise en œuvre de traitements de DII courts et éprouvants en termes de barrières (activité en eau, sel) doit permettre de sélectionner efficacement *L. sakei*, aux dépens des flores pathogènes ou d'altération.

Dans la suite, il faudra caractériser et prendre en compte la production d'acide lactique et sa diffusion au sein des morceaux de viande dans le modèle global de croissance. La croissance de *L. sakei* pourra alors être comparée à celle de bactéries pathogènes ou d'altération à l'aide de logiciels de simulation comme Sym'Previus ou par une étude plus approfondie sur le dispositif expérimental. Ces informations sont importantes pour juger de la bonne conduite de l'étape de fermentation en tant qu'étape de stabilisation. La colonisation de la surface de la viande par une flore bénéfique qui mobilise les ressources nutritionnelles et produit des substances antibactériennes (acides organiques, bactériocines, etc.) protège le produit contre les flores pathogènes et d'altération. La conception du procédé pourra alors se poursuivre en s'intéressant à l'étape de séchage en tant qu'étape de stabilisation finale et d'affinage du produit mais aussi en complexifiant la formulation des morceaux de viande (ajout de nitrites, épices, etc.).

En accord avec la stratégie expérimentale progressive associée à la modélisation utilisée dans ce travail, toutes ces perspectives de complexification doivent s'accompagner d'une analyse des phénomènes qui en découlent pour avancer vers une compréhension de plus en plus précise de la situation réelle.

Par ailleurs, l'utilisation du dispositif original associé à la stratégie expérimentale développée, pourra être élargie à l'étude d'autres situations de développement microbien à la surface d'aliments solides. Ainsi, d'autres flores positives (levures et moisissures d'affinage du fromage, etc.) ou négatives (pathogènes ou flores d'altération) pourront être étudiées dans une variété de milieux de culture. Enfin, le dispositif présente également un intérêt pour l'étude cinétique d'interactions entre espèces microbiennes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR. 1968. Détermination de l'humidité pour les viandes et produits à base de viande (NF V 04-401).
- Aggelis, G., Samelis, J., Metaxopoulos, J. 1998. A novel modelling approach for predicting microbial growth in a raw cured meat product stored at 3 degrees C and at 12 degrees C in air. *International Journal of Food Microbiology* 43, 39-52.
- Aguilera Radic, J.M., Chirife, J., Tapia de Daza, M.S., Welti-Chanes, J., Parada Arias, E. 1990. Inventario de Alimentos de Humedad Intermedia Tradicionales de Iberoamérica. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Mexico.
- Aldarf, M., Fourcade, F., Amrane, A., Prigent, Y. 2006. Substrate and metabolite diffusion within model medium for soft cheese in relation to growth of *Penicillium camembertii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33, 685-692.
- Alonge, D.O. 1987. Factors affecting the quality of smoke-dried meats in Nigeria. *Acta Alimentaria* 16, 263-270.
- Amézquita, A., Weller, C.L., Wang, L., Thippareddi, H.H., Burson, D.E. 2005. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology* 101, 123-144.
- Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., Chevallier, I. 2005. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology* 22, 529-538.
- Amrane, A., Prigent, Y. 1999. Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth and production phases of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74, 33-40.
- Antwi, M., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., Geeraerd, A.H. 2007. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. *International Journal of Food Microbiology* 120, 71-84.
- Arnau, J. 1998. Principales problemas tecnológicos en la elaboración del jamón curado. El jamón curado: Tecnología y análisis de consumo, Simposio Especial 44th International Congress of Meat Science and Technology, Barcelona. 71-86.

- Augustin, J.-C., Carlier, V. 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 56, 29-51.
- Augustin, J.-C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L. 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1019-1042.
- Axelsson, L., Katla, T., Bjørnslett, M., Eijsink, V.G.H., Holck, A.L. 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiology Letters* 168, 137-143.
- Baldini, P., Raczynski, R. 1979. The prosciutto (raw-ham) of Parma and San Daniele: changes in physico-chemical properties and microbial populations, *Proceedings of the International Meeting of Food Microbiology and Technology*, Parma. 107-117.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T. 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 48, 159-166.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26, 199-218.
- Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T.A., Roberts, T.A. 1996. Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology'. *Food Microbiology* 13, 83-91.
- Baranyi, J., Tamplin, M.L. 2004. ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. *Journal of Food Protection* 67, 1967-1971.
- Baty, F., Delignette-Muller, M.-L. 2004. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology* 91, 261-277.
- Benito, Y., Pin, C., Fernández, M., Marín, M.L., Selgas, M.D., García, M.L., Casas, C. 1996. Attachment of lactic acid bacteria to beef-muscle surfaces. *Folia Microbiologica* 41, 333-338.
- Bennani, L., Zenati, Y., Faid, M., Ettayebi, M. 1995. Physico-chemical and microbiological characteristics of a dried salted meat product (Kaddid) in Morocco. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 201, 528-532.
- Blickstad, E. 1984. The effect of water activity on growth and end-product formation of two *Lactobacillus* spp. and *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509T. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, 13-17.

- Bohuon, P. 1995. Déshydratation-imprégnation par immersion en solutions ternaires : étude des transports d'eau et de solutés sur gel et produits d'origine animale. PhD thesis, Université de Montpellier 2, Montpellier.
- Brocklehurst, T.F., Mitchell, G.A., Smith, A.C. 1997. A model experimental gel-surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology* 14, 303-311.
- Bros, M., Arnaud, E., Bohuon, P., Loiseau, G., Talon, R., Collignan, A. submitted. Modelling the effects of water activity, salt, pH, and lactic acid on *Lactobacillus sakei* surface growth using an original device.
- Bros, M., Arnaud, E., Loiseau, G., Talon, R., Collignan, A. 2012. Feasibility of Coupling Dehydration-Impregnation by Soaking Treatment of Meat with Fermentation by *Lactobacillus sakei*. *Journal of Food Science* 77, M434-M440.
- Brul, S., Coote, P. 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 1-17.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14, 313-326.
- Calderon Santoyo, M., Loiseau, G., Rodriguez Sanoja, R., Guyot, J.-P. 2003. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and [alpha]-amylase production at pH 4.0. *International Journal of Food Microbiology* 80, 77-87.
- Campbell-Platt, G. 1995. Fermented meats - A world perspective. In: Campbell-Platt, G., Cook, P.E., (Eds.), *Fermented Meats*. Blackie Academic and Professional, Glasgow. 39-52.
- Catte, M., Gancel, F., Dzierszinski, F., Tailliez, R. 1999. Effects of water activity, NaCl and smoke concentrations on the growth of *Lactobacillus plantarum* ATCC 12315. *International Journal of Food Microbiology* 52, 105-108.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Martin, V., Beaufls, S., Darbon-Rongere, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M. 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology* 23, 1527-1533.
- Champomier-Vergès, M.-C., Chaillou, S., Cornet, M., Zagorec, M. 2001. *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology* 152, 839-848.
- Champomier, M.-C., Montel, M.C., Grimont, F., Grimont, P.A.D. 1987. Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sakei*. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* 138, 751-758.

- , L., Fito, P. 2007. Application of the systematic approach to food engineering systems (SAFES) methodology to the salting and drying of a meat product: Tasajo. *Journal of Food Engineering* 83, 258-266.
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K. 2011. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science* In Press, Accepted Manuscript.
- Collignan, A., Bohuon, P., Deumier, F., Poligné, I. 2001. Osmotic treatment of fish and meat products. *Journal of Food Engineering* 49, 153-162.
- Collignan, A., Raoult-Wack, A.-L. 1994. Dewatering and salting of cod by immersion in concentrated sugar/salt solutions. *LWT - Food Science and Technology* 27, 259-264.
- Collignan, A., Santchurn, S.J., Zakhia, N. 2008. Dehydration of muscle foods. In: Hui, Y.H., Clary, C., Faid, M., Fasina, O., Noomhorn, A., Welti-Chanes, J., (Eds.), *Food Drying Science and Technology: Microbiology, Chemistry, Application*. DEStech Publications Inc., Lancaster. 721-744.
- Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., Villani, F. 2000. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science* 56, 321-329.
- Coquet, L., Cosette, P., Dé, E., Galas, L., Vaudry, H., Rihoey, C., Lerouge, P., Junter, G.-A., Jouenne, T. 2005. Immobilization Induces Alterations in the Outer Membrane Protein Pattern of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Proteome Research* 4, 1988-1998.
- Coroller, L., Guerrot, V., Huchet, V., Le Marc, Y., Mafart, P., Sohier, D., Thuault, D. 2005. Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology* 100, 167-178.
- Cussler, E.L. 1997. *Diffusion of Interacting Species, Diffusion - Mass Transfer in Fluid Systems*, Second ed. Cambridge University Press, Cambridge. 142-184.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., McMeekin, T.A. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* 23, 391-404.
- Dens, E.J., Bernaerts, K., Standaert, A.R., Kreft, J.U., Van Impe, J.F. 2005a. Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag - Part II. Modeling lag phenomena induced by temperature shifts. *International Journal of Food Microbiology* 101, 319-332.

- Dens, E.J., Bernaerts, K., Standaert, A.R., Van Impe, J.F. 2005b. Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag - Part I. The theory of cell division. *International Journal of Food Microbiology* 101, 303-318.
- Dens, E.J., Van Impe, J.F. 2001. On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology* 64, 247-260.
- Dens, E.J., Vereecken, K.M., Van Impe, J.F. 1999. A prototype model structure for mixed microbial populations in homogeneous food products. *Journal of Theoretical Biology* 201, 159-170.
- Deumier, F., Bohuon, P. 2005. Densities, viscosities and water activities of ternary NaCl-glucose syrup-water systems from 283.1 to 298.1 K. *Journal of Food Engineering* 68, 377-383.
- Deumier, F., Zakhia, N., Collignan, A. 1996. Formulation of a cured meat product by the dewatering-impregnation soaking (DIS) process: Mass transfer study and assessment of product quality. *Meat Science* 44, 293-306.
- Devlieghere, F., Debevere, J.M., Van Impe, J.F. 1998. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 41, 231-238.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M. 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology* 58, 93-106.
- Diep, D.B., Axelsson, L., Grefslis, C., Nes, I.F. 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* 146, 2155-2160.
- Dortu, C., Fickers, P., Franz, C.M.A.P., Ndagano, D., Huch, M., Holzapfel, W.H., Joris, B., Thonart, P. 2009. Characterisation of an antilisterial bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 isolated from raw poultry meat and determination of factors controlling its production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 1, 75-84.
- Doulia, D., Tzia, K., Gekas, V. 2000. A knowledge base for the apparent mass diffusion coefficient (DEFF) of foods. *International Journal of Food Properties* 3, 1-14.
- Durand, P. 1999. Technologies des produits de charcuterie et des salaisons. Technique et Documentation Lavoisier, Paris.

- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F. 2009. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1990-2001.
- Fadda, S.G., Anglade, P., Baraige, F., Zagorec, M., Talon, R., Vignolo, G.M., Champomier-Vergès, M.-C. 2010. Adaptive response of *Lactobacillus sakei* 23K during growth in the presence of meat extracts: A proteomic approach. *International Journal of Food Microbiology* 142, 36-43.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M. 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 100, 41-53.
- Gänzle, M.G., Ehmann, M., Hammes, W.P. 1998. Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2616-2623.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18, 1049-1056.
- Garriga, M., Aymerich, T. 2007. The microbiology of fermentation and ripening. In: Toldrá, F., (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 125-135.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Cenens, C., Van Impe, J.F. 1998. Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products. *International Journal of Food Microbiology* 44, 49-68.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J.M., Van Impe, J.F. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology* 91, 229-244.
- Gerla, P.E., Rubiolo, A.C. 2003. A model for determination of multicomponent diffusion coefficients in foods. *Journal of Food Engineering* 56, 401-410.
- Girard, J.P. 1988. La Déshydratation. In: Girard, J.P., (Ed.), *Technologie de la viande et des produits carnés*. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 83-116.
- Goffin, P., Deghorain, M., Mainardi, J.-L., Tytgat, I., Champomier-Vergès, M.-C., Kleerebezem, M., Hols, P. 2005. Lactate Racemization as a Rescue Pathway for Supplying d-Lactate to the Cell Wall Biosynthesis Machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 187, 6750-6761.

- Goli, T. 2012. Comportement des matrices protéiques acidifiées par immersion en solution concentrée. PhD thesis, Université de Montpellier 2, Sciences et Techniques, Montpellier.
- Grijnspeerdt, K., Vanrolleghem, P. 1999. Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology* 16, 593-605.
- Habimana, O., Heir, E., Langsrud, S., Åsli, A.W., Møretrø, T. 2010. Enhanced Surface Colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in Biofilms Formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* Isolate from Meat-Processing Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4557-4559.
- Hammes, W.P., Hertel, C. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science* 49, S125-S138.
- Hassan, A.N., Frank, J.F. 2004. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. *International Journal of Food Microbiology* 96, 103-109.
- Higgs, J.D. 2000. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Trends in Food Science & Technology* 11, 85-95.
- Holck, A.L., Axelsson, L., Hühne, K., Kröckel, L. 1994. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiology Letters* 115, 143-149.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Hori, K., Matsumoto, S. 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* 48, 424-434.
- Huang, L. 2008. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters - Determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions. *Journal of Food Science* 73, E235-E242.
- Huang, L. 2010. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. *International Journal of Food Microbiology* 140, 40-48.
- Huang, L. 2011. A new mechanistic growth model for simultaneous determination of lag phase duration and exponential growth rate and a new Bełhadradek-type model for evaluating the effect of temperature on growth rate. *Food Microbiology* 28, 770-776.
- Huff-Lonergan, E.J. 2010. Chemistry and Biochemistry of Meat. In: Toldrá, F., (Ed.), *Handbook of Meat Processing*. Wiley-Blackwell, Ames. 5-24.

- Hüfner, E., Hertel, C. 2008. Improvement of raw sausage fermentation by stress-conditioning of the starter organism *Lactobacillus sakei*. *Current Microbiology* 57, 490-496.
- Hüfner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq, A.-M., Zagorec, M., Hertel, C. 2007. Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2522-2531.
- Hugoo, P. 1993. Etude des techniques de conservation des produits animaux au Sahel. Cirad, Compiègne. 54 pages.
- Hutkins, R.W. 2006. Meat Fermentation, Microbiology and technology of fermented foods. Blackwell Publishing, Ames. 207-232.
- Igene, J.O., Farouk, M.M., Akanbi, C.T. 1990. Preliminary studies on the traditional processing of Kilishi. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 50, 89-98.
- Janssen, M., Geeraerd, A.H., Logist, F., De Visscher, Y., Vereecken, K.M., Debevere, J.M., Devlieghere, F., Van Impe, J.F. 2006. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. *International Journal of Food Microbiology* 111, 59-72.
- Juneja, V.K., Valenzuela Melendres, M., Huang, L., Subbiah, J., Thippareddi, H.H. 2009. Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45 °C. *International Journal of Food Microbiology* 131, 106-111.
- Kalilou, S., Collignan, A., Zakhia, N. 1998. Optimizing the traditional processing of beef into Kilishi. *Meat Science* 50, 21-32.
- Kalilou, S., Zakhia, N. 1999. Traditional methods for processing meat in Niger. *Tropical Science* 39, 18-22.
- Kapetanakou, A.E., Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N. 2011. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in vitro and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food Microbiology* 28, 727-735.
- Kauffman, R.G. 2012. Meat Composition. In: Hui, Y.H., (Ed.), *Handbook of Meat and Meat Processing*, Second ed. CRC Press, Boca Raton. 45-62.
- Kilic, B. 2009. Current trends in traditional Turkish meat products and cuisine. *LWT - Food Science and Technology* 42, 1581-1589.

- Kinsella, K.J., Rowe, T.A., Blair, I.S., McDowell, D.A., Sheridan, J.J. 2007. The influence of attachment to beef surfaces on the survival of cells of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, at different aw values and at low storage temperatures. *Food Microbiology* 24, 786-793.
- Korkeala, H., Alanko, T., Tiusanen, T. 1992. Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica* 33, 27-32.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N. 2004a. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology* 21, 415-422.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N. 2004b. Modeling the Boundaries of Growth of *Salmonella* Typhimurium in Broth as a Function of Temperature, Water Activity, and pH. *Journal of Food Protection* 67, 53-59.
- Kumar, C.G., Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9-27.
- Labadie, J. 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science* 52, 299-305.
- Lagarias, J.C., Reeds, J.A., Wright, M.H., Wright, P.E. 1998. Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. *Siam Journal on Optimization* 9, 112-147.
- Larpent, J.P. 1996. Les Bactéries Lactiques. In: Bourgeois, C.M., Larpent, J.P., (Eds.), *Microbiologie Alimentaire*, vol. 2, Second ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 4-35.
- Lauret, R., Morel-Deville, F., Berthier, F., Champomier-Vergès, M.-C., Postma, P., Ehrlich, S.D., Zagorec, M. 1996. Carbohydrate Utilization in *Lactobacillus sake*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1922-1927.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D. 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, 219-237.
- Lebert, I., Bégot, C., Lebert, A. 1998. Development of two *Listeria monocytogenes* growth models in a meat broth and their application to beef meat. *Food Microbiology* 15, 499-509.
- Lebert, I., Dussap, C.G., Lebert, A. 2004. Effect of aw, controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology* 94, 67-78.

- Lebert, I., Dussap, C.G., Lebert, A. 2005. Combined physico-chemical and water transfer modelling to predict bacterial growth during food processes. *International Journal of Food Microbiology* 102, 305-322.
- Lebert, I., Leroy, S., Talon, R. 2007a. Microorganisms in Traditional Fermented Meats. In: Toldrá, F., (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 113-124.
- Lebert, I., Nicolas, C., Portanguen, S., Lebert, A. 2007b. Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process. *Journal of Food Engineering* 78, 1371-1381.
- Lebert, I., Robles-Olvera, V., Lebert, A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology* 61, 27-39.
- Leesing, R. 2005. Identification et validation de marqueurs spécifiques pour la traçabilité de poissons d'aquaculture lors de leur import-export. PhD thesis, Université de Montpellier 2, Montpellier.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.
- Leporq, B., Membré, J.-M., Dervin, C., Buche, P., Guyonnet, J.P. 2005. The "Sym'Previus" software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *International Journal of Food Microbiology* 100, 231-237.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 1999a. The Presence of Salt and a Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5350-5356.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 1999b. Temperature and pH Conditions That Prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocin Sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 974-981.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2003. A Combined Model To Predict the Functionality of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1093-1099.
- Leroy, F., Degeest, B., De Vuyst, L. 2002. A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. *International Journal of Food Microbiology* 73, 251-259.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285.

- Li, Y.-H., Hanna, M.N., Svensäter, G., Ellen, R.P., Cvitkovitch, D.G. 2001. Cell Density Modulates Acid Adaptation in *Streptococcus mutans*: Implications for Survival in Biofilms. *Journal of Bacteriology* 183, 6875-6884.
- Llaneras, F., Picó, J. 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105, 1-11.
- Lopez, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J. 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology* 96, 289-300.
- Lorenzo, J.M., Prieto, B., Carballo, J., Franco, I. 2003. Compositional and degradative changes during the manufacture of dry-cured 'lacón'. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 593-601.
- Luedeking, R., Piret, E.L. 2000. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH (Reprinted from *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, vol 1, pg 393, 1959). *Biotechnology and Bioengineering* 67, 636-644.
- Marceau, A., Zagorec, M., Chaillou, S., Méra, T., Champomier-Vergès, M.-C. 2004. Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7260-7268.
- Marceau, A., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.-C. 2002. Analysis of *Lactobacillus sakei* adaptation to its environment by a proteomic approach. *Sciences des Aliments* 22, 97-105.
- Marceau, A., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.-C. 2003. Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Research in Microbiology* 154, 37-42.
- Marín, M.L., Benito, Y., Pin, C., Fernández, M.F., García, M.L., Selgas, M.D., Casas, C. 1997. Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Letters in Applied Microbiology* 24, 14-18.
- Marks, B.P. 2008. Status of Microbial Modeling in Food Process Models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 137-143.
- Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Pla, M., Aymerich, T. 2006. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6040-6048.
- McDonald, K., Sun, D.-W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52, 1-27.

- McKellar, R.C. 1997. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology* 36, 179-186.
- Meldrum, R.J., Brocklehurst, T.F., Wilson, D.R., Wilson, P.D.G. 2003. The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10°C. *Food Microbiology* 20, 97-103.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T. 2003. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 83, 281-293.
- Mercier, G.P., Schmitt, R.E., Schmidt-Lorenz, W. 1989. Studies on ripening of Bündnerfleisch, Untersuchungen über die Reifung von Bündnerfleisch. *Fleischwirtschaft* 69, 1593-1598.
- Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F., De Vuyst, L. 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology* 81, 41-52.
- Molinero, C., Martínez, B., Rubio, B., Rovira, J., Jaime, I. 2008. The effects of extended curing on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Cecina de León. *Meat Science* 80, 370-379.
- Montel, M.C., Champomier-Vergès, M.-C. 1987. Arginine catabolism in *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2683-2685.
- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R. 1998. Bacterial role in flavour development. *Meat Science* 49, S111-S123.
- Montel, M.C., Talon, R., Berdagué, J.L., Cantonnet, M. 1993. Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of French dry sausages. *Meat Science* 35, 229-240.
- Møretrø, T., Hagen, B.F., Axelsson, L. 1998. A new, completely defined medium for meat lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 85, 715-722.
- Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., Baird, R.M. 1995. *Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Muñoz-Cuevas, M., Fernández, P.S., George, S.M., Pin, C. 2010. Modeling the Lag Period and Exponential Growth of *Listeria monocytogenes* under Conditions of Fluctuating Temperature and Water Activity Values. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2908-2915.
- Neysens, P., Messens, W., De Vuyst, L. 2003. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology* 88, 29-39.

- Nicolai, B.M., Van Impe, J.F., Verlinden, B., Martens, T., Vandewalle, J., De Baerdemaeker, J. 1993. Predictive modelling of surface growth of lactic acid bacteria in vacuum-packed meat. *Food Microbiology* 10, 229-238.
- Nielsen, M.-B., Knudsen, G.M., Danino-Appleton, V., Olsen, J.E., Thomsen, L.E. 2013. Comparison of heat stress responses of immobilized and planktonic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology* 33, 221-227.
- Noriega, E., Laca, A., Díaz, M. 2008. Modelling of diffusion-limited growth to predict *Listeria* distribution in structured model foods. *Journal of Food Engineering* 87, 247-256.
- Noriega, E., Laca, A., Díaz, M. 2009. *Listeria* growth under diffusional limitations in synthetic meats. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 725-734.
- Norman, G.A., Corte, O.O. 1985. Dried and Salted Meats: Charque and Carne de Sol. FAO Animal Production and Health Paper, 1-32.
- Nortjé, K., Buys, E.M., Minnaar, A. 2005. Effect of [gamma]-irradiation on the sensory quality of moist beef biltong. *Meat Science* 71, 603-611.
- Obanu, Z.A. 1988. Preservation of meat in Africa by control of the internal aqueous environment in relation to product quality and stability. In: Seow, C.C., Teng, T.T., Quah, C.H., (Eds.), *Food preservation by moisture control*. Elsevier Applied Science Publishers, London. 161-173.
- Office-Fédéral-de-l'Agriculture. 1999. Registre des appellations d'origine et des indications géographiques: Cahier des charges de la viande des grisons.
- Paleari, M.A., Bersani, C., Moretti Vittorio, M., Beretta, G. 2002. Effect of curing and fermentation on the microflora of meat of various animal species. *Food Control* 13, 195-197.
- Papathomopoulou, K., Kotzekidou, P. 2009. Inactivation of verocytotoxigenic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* co-cultured with *Lactobacillus sakei* in a simulated meat fermentation medium. *Journal of Food Safety* 29, 331-347.
- Parker, M.L., Gunning, P.A., Macedo, A.C., Malcata, F.X., Brocklehurst, T.F. 1998. The microstructure and distribution of micro-organisms within mature Serra cheese. *Journal of Applied Microbiology* 84, 523-530.
- Passos, F.V., Fleming, H.P., Ollis, D.F., Felder, R.M., McFeeters, R.F. 1994. Kinetics and Modeling of Lactic Acid Production by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2627-2636.

- Pearson, A.M., Gillet, T.A. 1999. Composition and Nutritive Value of Raw Materials and Processed Meats, Processed Meats, Third ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg. 23-52.
- Petäjä-Kanninen, E., Puolanne, E. 2007. Principles of Meat Fermentation. In: Toldrá, F., (Ed.), Handbook of Fermented Meat and Poultry. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 31-36.
- Piette, J.P.G., Idziak, E.S. 1989. New method to study bacterial adhesion to meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1531-1536.
- Pin, C., Baranyi, J. 2006. Kinetics of single cells: Observation and modeling of a stochastic process. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2163-2169.
- Pin, C., Sutherland, J.P., Baranyi, J. 1999. Validating predictive models of food spoilage organisms. *Journal of Applied Microbiology* 87, 491-499.
- Pinon, A., Zwietering, M.H., Perrier, L., Membré, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Vialette, M. 2004. Development and Validation of Experimental Protocols for Use of Cardinal Models for Prediction of Microorganism Growth in Food Products. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1081-1087.
- Pinto, M.F., Ponsano, E.H.G., Franco, B.D.G.M., Shimokomaki, M. 2002. Charqui meats as fermented meat products: role of bacteria for some sensorial properties development. *Meat Science* 61, 187-191.
- Poligné, I., Collignan, A., Trystram, G. 2001. Characterization of traditional processing of pork meat into boucané. *Meat Science* 59, 377-389.
- Poma, J.P. 1998. Le jambon sec et les petites salaisons. Editions Erti, Paris.
- Poschet, F., Vereecken, K.M., Geeraerd, A.H., Nicolai, B.M., Van Impe, J.F. 2005. Analysis of a novel class of predictive microbial growth models and application to coculture growth. *International Journal of Food Microbiology* 100, 107-124.
- Pouillot, R., Lubran, M.B. 2011. Predictive microbiology models vs. modeling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: What parameters matter and why. *Food Microbiology* 28, 720-726.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2355-2360.
- Rao, D.N. 1997. Intermediate moisture foods based on meats—a review. *Food Reviews International* 13, 519-551.

- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Niranjan, K., Knorr, D. 2002. Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends in Food Science & Technology* 13, 48-59.
- Ratkowsky, D.A. 2003. Model fitting and uncertainty. In: McKellar, R.C., Lu, X., (Eds.), *Modelling microbial responses in food*. CRC Press, Washington D. C. 151-196.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* 149, 1-5.
- Reyes-Cano, R., Dorantes-Alvarez, L., Hernandez-Sanchez, H., Gutierrez-Lopez, G.F. 1994. A traditional intermediate moisture meat: Beef cecina. *Meat Science* 36, 365-370.
- Rimaux, T., Vrancken, G., Pothakos, V., Maes, D., De Vuyst, L., Leroy, F. 2011. The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. *Food Microbiology* 28, 597-604.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M. 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44, 83-92.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3-16.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231-245.
- Ross, T., McMeekin, T.A. 2003. Modeling Microbial Growth Within Food Safety Risk Assessments. *Risk Analysis* 23, 179-197.
- Ross, T., Ratkowsky, D.A., Mellefont, L.A., McMeekin, T.A. 2003. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 82, 33-43.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P. 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8 degrees C: Consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection* 59, 944-949.
- Ruiz, J. 2007. Ingredients. In: Toldrá, F., (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 159-170.
- Sampathkumar, B., Napper, S., Carrillo, C.D., Willson, P., Taboada, E., Nash, J.H.E., Potter, A.A., Babiuk, L.A., Allan, B.J. 2006. Transcriptional and translational expression patterns associated with immobilized growth of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 152, 567-577.

- Santchurn, S.J. 2009. Analyse et compréhension des mécanismes de transferts de matière lors de l'immersion d'une pièce de viande dans une solution complexe : étude expérimentale et modélisation. PhD thesis, Université de la Réunion, Saint Denis, La Réunion, France.
- Santchurn, S.J., Arnaud, E., Zakhia-Rozis, N., Collignan, A. 2011. Drying: Principles and Applications. In: Hui, Y.H., (Ed.), Handbook of Meat and Meat Processing, Second Edition ed. CRC Press, Boca Raton. 505-522.
- Santchurn, S.J., Collignan, A., Trystram, G. 2007. Impact of solute molecular mass and molality, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution. *Journal of Food Engineering* 78, 1188-1201.
- Sanz, Y., Toldrá, F. 1997. Purification and Characterization of an Aminopeptidase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1552-1558.
- Schvartzman, M.S., Maffre, A., Tenenhaus-Aziza, F., Sanaa, M., Butler, F., Jordan, K.N. 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 145, Supplement 1, S31-S38.
- Shi, X., Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* 20, 407-413.
- Silla Santos, H.M. 1998. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology* 39, 227-230.
- Skandamis, P.N., Brocklehurst, T.F., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E. 2007. Image analysis as a mean to model growth of *Escherichia coli* O157 : H7 in gel cassettes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 937-947.
- Solignat, G. 1999. Séchage - Maturation. In: Durand, P., (Ed.), Technologies des produits de charcuterie et des salaisons. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 279-391.
- Solomon, I.P., O., E.E., O., O.A. 1994. Effects of salt (NaCl) level and smoke application on chemical and sensory characteristics of unam inung, a cured Nigerian pork product. *Der Tropenlandwirt. Zeitschrift für die Landwirtschaft in den Tropen und Subtropen* 95, 157-169.
- Stentz, R., Loizel, C., Malleret, C., Zagorec, M. 2000. Development of Genetic Tools for *Lactobacillus sakei*: Disruption of the β -Galactosidase Gene and Use of lacZ as a Reporter Gene To Study Regulation of the Putative Copper ATPase, AtkB. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4272-4278.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331-345.
- Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 137-159.

- Tempest, D.W., Meers, J.L. 1968. The influence of NaCl concentration of the medium on the potassium content of *Aerobacter aerogenes* and on the inter-relationships between potassium, magnesium and ribonucleic acid in the growing bacteria. *Journal of General Microbiology* 54, 319-325.
- Theys, T.E., Geeraerd, A.H., Devlieghere, F., Van Impe, J.F. 2010. On the selection of relevant environmental factors to predict microbial dynamics in solidified media. *Food Microbiology* 27, 220-228.
- Theys, T.E., Geeraerd, A.H., Verhulst, A.J., Poot, K., Bree, I.V., Devlieghere, F., Moldenaers, R., Wilson, D., Brocklehurst, T.F., Van Impe, J.F. 2008. Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 128, 67-77.
- Tichaczek, P.S., Vogel, R.F., Hammes, W.P. 1994. Cloning and sequencing of sakP encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. *Microbiology* 140, 361-367.
- Tomić, N., Tomašević, I., Radovanović, R., Rajković, A. 2008. "Uzice beef prshuta": Influence of different salting processes on sensory properties. *Journal of Muscle Foods* 19, 237-246.
- Trystram, G. 2007. Déshydratation-Imprégnation. In: Bimbenet, J.-J., Duquenoy, A., Trystram, G., (Eds.), *Génie des Procédés Alimentaires - Des bases aux applications*, Second ed. Dunod, Paris. 274-278.
- Vadasz, P., Vadasz, A.S. 2007. Biological implications from an autonomous version of Baranyi and Roberts growth model. *International Journal of Food Microbiology* 114, 357-365.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 187-216.
- Van der Riet, W.B. 1976. Studies on the mycoflora of biltong. *South African Food Review* 3, 105-111.
- Van der Sman, R.G.M., Boer, E. 2005. Predicting the initial freezing point and water activity of meat products from composition data. *Journal of Food Engineering* 66, 469-475.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., Vandewalle, J. 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2901-2909.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Schellekens, M., Martens, T., Debaerdemaeker, J. 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology* 25, 227-249.
- Van Impe, J.F., Poschet, F., Geeraerd, A.H., Vereecken, K.M. 2005. Towards a novel class of predictive microbial growth models. *International Journal of Food Microbiology* 100, 97-105.

- Vereecken, K.M., Dens, E.J., Van Impe, J.F. 2000. Predictive modeling of mixed microbial populations in food products: Evaluation of two-species models. *Journal of Theoretical Biology* 205, 53-72.
- Vereecken, K.M., Van Impe, J.F. 2002. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 73, 239-250.
- Verhulst, A.J., Cappuyns, A.M., Van Derlinden, E., Bernaerts, K., Van Impe, J.F. 2011. Analysis of the lag phase to exponential growth transition by incorporating inoculum characteristics. *Food Microbiology* 28, 656-666.
- Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G.-A., Jouenne, T. 2004. Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Analytical Biochemistry* 329, 120-130.
- Vogel, R.F., Lohmann, M., Weller, A.N., Hugas, M., Hammes, W.P. 1991. Structural similarity and distribution of small cryptic plasmids of *Lactobacillus curvatus* and *L. sake*. *FEMS Microbiology Letters* 84, 183-190.
- Whiting, R.C. 1995. Microbial modeling in foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 467-494.
- Wijtzes, T., De Wit, J.C., Huis in't Veld, J.H.J., Van't Riet, K., Zwietering, M.H. 1995. Modelling Bacterial Growth of *Lactobacillus curvatus* as a Function of Acidity and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2533-2539.
- Wijtzes, T., Rombouts, F.M., Kant-Muermans, M.L.T., Van't Riet, K., Zwietering, M.H. 2001. Development and validation of a combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of *Lactobacillus curvatus*. *International Journal of Food Microbiology* 63, 57-64.
- Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T., Van Impe, J.F. 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73, 275-289.
- Wimpenny, J.W.T., Leistner, L., Thomas, L.V., Mitchell, A.J., Katsaras, K., Peetz, P. 1995. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *International Journal of Food Microbiology* 28, 299-315.
- Zeuthen, P. 2007. A historical perspective of meat fermentation. In: Toldrá, F., (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 3-8.

- Zhang, Y., Mao, Y., Li, K., Dong, P., Liang, R., Luo, X. 2011. Models of *Pseudomonas* Growth Kinetics and Shelf Life in Chilled *Longissimus dorsi* Muscles of Beef. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24, 713-722.
- Zhou, K., George, S.M., Metris, A., Li, P.L., Baranyi, J. 2011. Lag Phase of *Salmonella enterica* under Osmotic Stress Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1758-1762.
- Zhu, M., Takenaka, S., Sato, M., Hoshino, E. 2001. Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology* 16, 24-27.
- Zukál, E., Incze, K. 2010. Drying. In: Toldrá, F., (Ed.), *Handbook of Meat Processing*. Jon Wiley & Sons, Inc., Ames. 219-232.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Notermans, S. 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.

ANNEXE

Annexe 1. Courbes de croissance de *Lactobacillus sakei* en dispositif contenant du milieu de culture MYG formulé.

